

**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIA**

**ROL DE DINAMINA-2 EN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA EXCITATORIA
HIPOCAMPAL Y EN LA FUNCIÓN COGNITIVA EN UN MODELO MURINO DE
MIOPATÍA CENTRONUCLEAR**

Jorge Alexis Arriagada Díaz

Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencias

Directora de Tesis

Dra. Arlek González Jamett

Co-director de Tesis

Dr. Álvaro Ardiles Araya

Julio 2021

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todos aquellos que han participado en este proceso y han desempeñado un papel importante en mi vida académica. A mi familia, que me ha apoyado durante todo este tiempo, incentivándome a seguir por este difícil camino y celebrando constantemente mis pequeños logros en mi corta carrera científica. A mis amigos de toda la vida, con quienes he compartido maravillosos momentos de alegría, pena, felicidad, paz, etc... A mi polola, que ha estado conmigo pase lo que pase todo este tiempo, incluida la cuarentena, y ha sido un pilar de apoyo y amor fundamental todo este tiempo. No puedo dejar de mencionar a mis compañeros de magister y laboratorio, con quienes he compartido alegrías, frustraciones, innumerables momentos de stress, noches de insomnio, y a quienes admiro profundamente. Finalmente, me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a mis profesores y guías, Arlek González y Álvaro Ardiles, los cuales siempre estuvieron conmigo enseñándome y acompañándome en cada momento, sin ellos no habría podido lograr este objetivo. Una mención especial para Pablo Muñoz, quien al igual que mis tutores, siempre estuvo presente en mis aprendizajes y me introdujo en esta área de investigación.

Resumen

Dinamina-2 es una GTP-asa que se expresa ubicuamente en distintos tejidos y que regula el remodelamiento de membranas, controlando procesos como la endocitosis, la exocitosis y el tráfico intracelular. Dinamina-2 además modula la organización y dinámica del citoesqueleto de actina en distintos tipos celulares. Mutaciones en dinamina-2 causan una forma autosómica dominante de miopatía centronuclear (MCN), un trastorno neuromuscular congénito raro caracterizado por debilidad progresiva y atrofia de los músculos esqueléticos distales. Aunque las mutaciones en dinamina-2 causantes de MCN producen primariamente una enfermedad muscular, reportes clínicos que describen defectos cognitivos en pacientes con MCN sugieren además alteraciones en el sistema nervioso central. En esta tesis utilizamos como modelo experimental un ratón portador de la mutación p.R465W en dinamina-2, la que más comúnmente causa MCN, y evaluamos como esa mutación afecta la transmisión y la plasticidad sináptica excitatoria y la función cognitiva en ratones modelo de MCN. Específicamente, la transmisión sináptica excitatoria basal se evaluó en rebanadas hipocampales mediante un protocolo de entrada-salida, mientras que para el análisis del proceso de plasticidad sináptica se utilizó un protocolo de estimulación de alta frecuencia (TBS) y uno de baja frecuencia (LFS), capaz de inducir potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) de la respuesta sináptica, respectivamente. Nuestros resultados muestran que la mutación p.R465W afecta la función de dinamina-2 en las sinapsis excitatorias hipocampales, conduciendo a un deterioro de la transmisión sináptica basal. Adicionalmente, observamos un deterioro de la capacidad de inducción y mantención tanto de la LTP como de la LTD en ratones portadores de la mutación p.R465W. Por otro lado, la función cognitiva se evaluó mediante la aplicación de dos pruebas

conductuales: Barnes maze (BM) y Novel object recognition (NOR). Ratones portadores de la mutación p.R465W en dinamina-2 mostraron defectos en el aprendizaje y en la memoria espacial y de reconocimiento, congruente con defectos sinápticos a nivel hipocampal y posiblemente también a nivel cortical en el modelo de MCN.

Este estudio podría tener implicaciones valiosas para comprender mejor el papel de dinamina-2 en la transmisión sináptica excitatoria y en la neuroplasticidad y para entender el porqué de los defectos del aprendizaje que se manifiestan tempranamente en pacientes con MCN.

Contenido

Introducción	7
Dinamina y su papel en el sistema nervioso central.	7
Dinamina-2 como potencial modulador del tráfico de AMPAR y de la transmisión y plasticidad sináptica excitatoria.	8
Mutaciones en dinamina-2 y Miopatía Centronuclear (MCN)	12
Pregunta de investigación.....	16
Hipótesis.....	18
Estrategia experimental	18
Objetivo General	19
Objetivos específicos	19
Materiales y metodología	19
Registros electrofisiológicos de campo	19
Transmisión sináptica excitatoria basal	20
Plasticidad sináptica a corto plazo	21
Plasticidad sináptica a largo plazo	22
Potenciación a largo plazo (LTP).....	22
Depresión a largo plazo (LTD)	22
Experimentos conductuales para evaluación del aprendizaje y memoria	24
Novel Object Recognition (NOR).....	24
Barnes Maze (BM)	27
Open field (OF)	30
Resultados	31
Objetivo específico 1.....	31

Deterioro de la transmisión sináptica excitatoria basal en cerebros de ratones HTZ modelo de MCN.....	31
Objetivo Especifico 2.....	33
Plasticidad sináptica a corto plazo	33
Deterioro de la plasticidad sináptica a largo plazo en cerebros de ratones HTZ modelo de MCN.....	34
Objetivo Especifico 3.....	42
Deterioro del aprendizaje y la memoria en ratones HTZ modelo de MCN	42
Discusión.....	47
¿De qué manera mutaciones en dinamina-2 causantes de MCN podrían afectar la transmisión sináptica excitatoria, la plasticidad sináptica y las funciones cognitivas de ratones HTZ portadores de la mutación p.R465W?	48
Posibles implicaciones de la mutación p.R465W en dinamina-2 a nivel pre-sináptico.....	51
¿Cómo la mutación p.R465W puede afectar la estructura y el funcionamiento de dinamina-2?	53
Proyecciones.....	55
Referencias	57

Tabla de Figuras

Figura 1. Rutas del tráfico de AMPAR en la densidad postsináptica.....	11
Figura 2. Organización estructural y funcional de Dinamina-2.....	15
Figura 3. La inhibición farmacológica de la actividad GTPasa de dinamina disminuye la potenciación a largo plazo (LTP).....	17
Figura 4. Representación esquemática de la configuración experimental.....	23
Figura 5. Laberinto utilizado en la prueba conductual NOR.....	26
Figura 6. Laberinto utilizado en la prueba conductual BM.....	29
Figura 7. Laberinto utilizado en la prueba conductual de OF.....	30
Figura 8. Deterioro de la transmisión sináptica excitatoria basal.....	32
Figura 9. Plasticidad a corto plazo, Facilitación por pulsos pareados.....	33
Figura 10. Deterioro de la LTP inducida por TBS.....	35
Figura 11. Deterioro de la LTP inducida por glicina.....	37
Figura 12. El deterioro de la LTP es independiente de la transmisión sináptica inhibitoria.....	38
Figura 13. Deterioro de la LTD inducida por LFS.....	40
Figura 14. Deterioro de la LTD inducida por NMDA.....	41
Figura 15: Ratones HTZ muestran un deterioro en la memoria de reconocimiento al ser sometidos al test NOR.....	43
Figura 16: Ratones HTZ muestran deterioro de la memoria espacial en la prueba de BM.....	45
Figura 17: Ratones HTZ no muestran dificultades en el desplazamiento.....	46

Introducción

Dinamina y su papel en el sistema nervioso central.

Las proteínas de la superfamilia de Dinaminas (DSP) son mecano-enzimas con actividad GTP-asa que catalizan la remodelación de membranas (Antonny et al., 2016; S. M. Ferguson & De Camilli, 2012; González-Jamett et al., 2014a; González-Jamett, Momboisse, Haro-Acuña, et al., 2013; Singh et al., 2017) participando de diferentes procesos que incluyen endocitosis mediada por clatrina (CME) (Damke et al., 1994; Loerke et al., 2009; Rappoport & Simon, 2003; Warnock & Schmid, 1996), internalización caveolar (J. R. Henley et al., 1998), exocitosis (González-Jamett et al., 2010; González-Jamett, Momboisse, Guerra, et al., 2013; Kroll et al., 2015), reciclaje endosomal (Nicoziani et al., 2000), transporte de vesículas secretoras desde la red del trans-golgi (TNG) hacia la membrana plasmática (Jones et al., 1998; Kreitzer et al., 2000) y fusión y fisión de mitocondrias (Chappie et al., 2011) entre otras. Además, las DSPs participan en procesos independientes de la remodelación de membranas, como la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina (González-Jamett et al., 2014b; González-Jamett, Guerra, et al., 2017; Gu et al., 2010; Mooren et al., 2009; R. Zhang et al., 2020) y de microtúbulos (Hamao et al., 2009; Ishida et al., 2011; Maeda et al., 1992). Entre las DSPs se cuentan proteínas tipo dinamina y dinaminas clásicas (Arriagada-Díaz et al., 2020).

En mamíferos, las dinaminas clásicas están codificadas por tres genes: DNM1, DNM2 y DNM3 localizados en los cromosomas 9 (Klocke et al., 1997), 19 (Züchner et al., 2005) y 1 (Noakes et al., 1999), respectivamente. De las tres isoformas de dinamina, sólo dinamina-2 se expresa ubicuamente en distintos tejidos y ha demostrado ser crítica durante el desarrollo embrionario (Koutsopoulos et al., 2011). De hecho, mientras la ausencia de dinamina-1 y dinamina-3 puede ser compensada por las otras isoformas (Raimondi et al., 2011) el knock-out de dinamina-2 es

incompatible con la vida (S. Ferguson et al., 2009) lo que deja de manifiesto la importancia de dinamina-2 en los tejidos donde se expresa.

En el sistema nervioso central, dinamina-2 se expresa tanto en la pre-sinápsis como en la post-sinápsis, desde donde participa en la modulación de la transmisión sináptica (Arriagada-Díaz et al., 2020; González-Jamett et al., 2014). A nivel post-sináptico, dinamina-2 se encuentra en mayor proporción (P. M. Okamoto et al., 2001) y se ha visto que juega un rol importante controlando el número de receptores disponibles en la membrana plasmática. En esta línea se ha sugerido que dinamina-2 participa en el reciclaje de receptores ionotrópicos de glutamato, principales moduladores de la transmisión sináptica excitatoria en el cerebro mamífero. Carroll y colaboradores en el año 1999 demostraron que la inhibición de la actividad GTP-asa de dinamina-2, mediante la expresión de la mutante dominante negativa K44A, incapaz de unir e hidrolizar GTP, interrumpe la CME de los receptores glutamatérgicos tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) en neuronas hipocámpales en cultivo (Carroll et al., 1999). **Esto último sugiere que dinamina-2 juega un importante rol en las sinapsis excitatorias controlando la densidad de AMPAR en la superficie celular.**

Dinamina-2 como potencial modulador del tráfico de AMPAR y de la transmisión y plasticidad sináptica excitatoria.

El tráfico de AMPAR hacia o desde las densidades post-sinápticas (PSDs) en espinas dendríticas, es uno de los principales mecanismos regulatorios que nos permiten comprender cambios en la eficacia de la transmisión sináptica, fenómeno que posteriormente constituye un proceso dinámico, llamado plasticidad sináptica (PS). La PS ha demostrado ser la base de funciones cerebrales superiores como, la memoria y el aprendizaje (Anggono & Huganir, 2012; J. M. Henley et al., 2011). En general, un aumento en la inserción de AMPAR en las sinapsis se

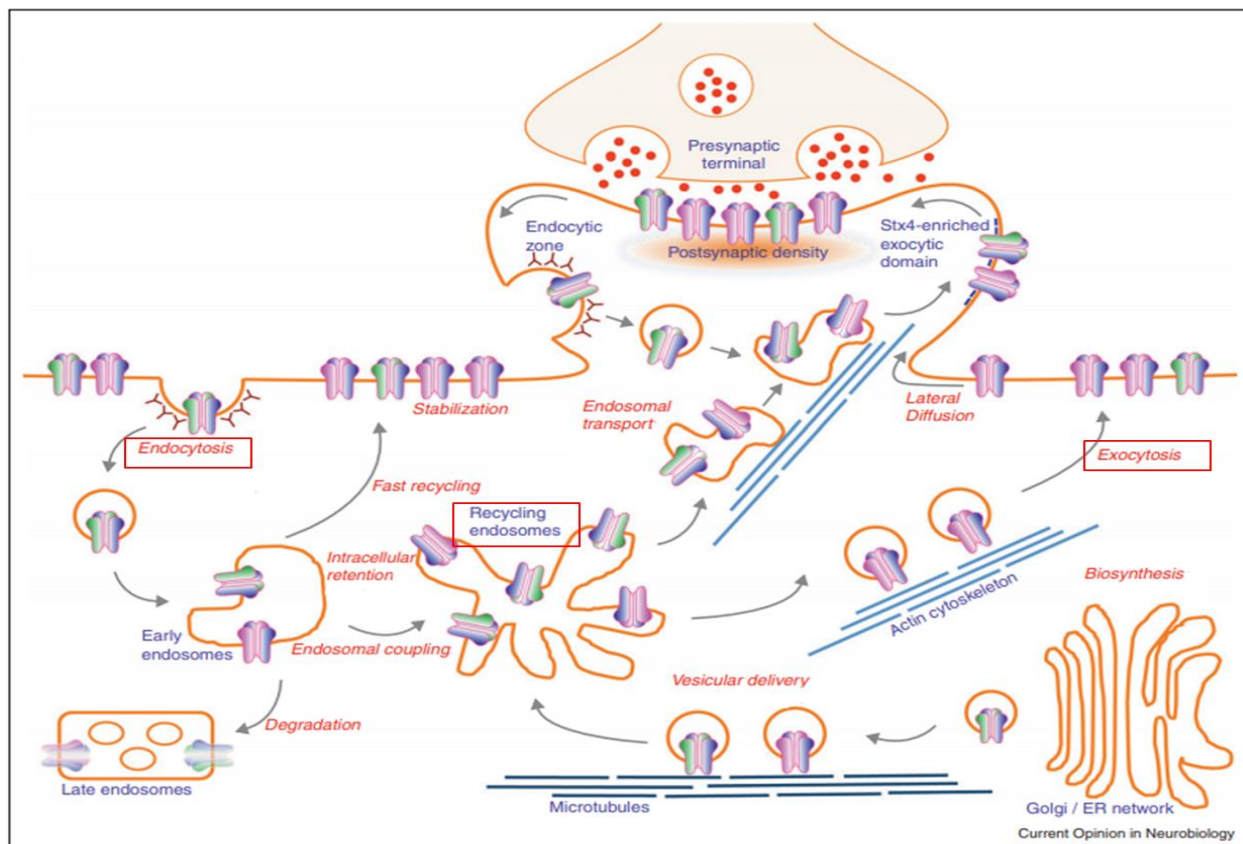
correlaciona con la inducción de una potenciación a largo plazo (LTP) de la eficacia sináptica, mientras que la remoción de AMPAR desde las PSDs conduce a una depresión a largo plazo (LTD) de la misma (Anggono & Huganir, 2012).

La inducción de LTP o LTD en sinapsis excitatorias, está determinada por el patrón de actividad de las neuronas pre-sinápticas y la cinética y magnitudes del influjo de Ca^{2+} intracelular a través de la activación del receptor glutamatergico N-metil-D-aspartato (NMDAR) en la membrana post-sináptica (Bliss & Cooke, 2011; Lüscher & Malenka, 2012). Diferentes patrones en la señal del Ca^{2+} en las neuronas post-sinápticas activan diferentes cascadas de señalización intracelular que modulan selectivamente la direccionalidad de la PS. La activación de kinasas y fosfatasas dependientes de Ca^{2+} determina la fosforilación/desfosforilación de diversas moléculas que participan en la inducción y mantención de la PS. Con respecto a esto, AMPAR es un sustrato clave, en el que la fosforilación de su subunidad GluR1 es una señal que favorece el tráfico de los receptores hacia la membrana superficial. Este aumento en la densidad de AMPAR en las PSDs, genera un cambio en la eficacia sináptica, lo que se observa como una potenciación de la fuerza de dichas sinapsis. En cambio, la desfosforilación de GluR1 favorece la internalización de AMPAR y consecuentemente determina la depresión de la fuerza sináptica (Lee, 2006). La internalización de AMPAR durante la LTD involucra la endocitosis del receptor a través de CME mediada por dinamina-2 (Carroll et al., 1999) en zonas endocíticas (EZ) adyacentes a las PSDs (J. Lu et al., 2007). Dinamina-2 dirige la internalización de AMPAR al interactuar a través de su dominio PH con la proteína Arc / Ag3.1 (Chowdhury et al., 2006) la que a su vez aumenta la actividad GTP-asa de la dinamina-2 (Byers et al., 2015). A partir de las EZ, los AMPAR se someten a procesos de clasificación endosomal que pueden llevarlos a una vía de degradación lisosomal a través de endosomas tardíos o de regreso a la membrana plasmática a través de endosomas de reciclaje (RE) (Ehlers, 2000; Park et al., 2004). En respuesta a altas frecuencias de

actividad sináptica, los RE se mueven hacia las espinas dendríticas, lo que promueve la inserción local de AMPAR en las PSDs (Park et al., 2006). Interesantemente, se ha sugerido que la participación de dinamina-2 en el tráfico de AMPAR parece depender de la actividad neuronal. En este sentido, estudios sugieren que la internalización y el reciclaje constitutivo de AMPAR en neuronas del hipocampo no requieren ni de CME ni de la actividad GTP-asa de las dinaminas (Fujii et al., 2017; Glebov et al., 2015). Sin embargo, la inducción de LTD mediante el uso de pulsos de estimulación de baja frecuencia se ve significativamente afectada por la inhibición farmacológica de la actividad GTP-asa de las dinaminas (Fujii et al., 2017; Glebov et al., 2015; Man et al., 2000) confirmando así que estas mecano-enzimas participan en el tráfico de AMPAR bajo patrones específicos de actividad sináptica. En esta misma línea, en el año 2015, Zheng y sus colaboradores demostraron que los AMPAR se reciclan de forma independiente de la actividad de dinaminas en ausencia de estimulación sináptica, pero que en respuesta a la inducción química de LTP el reciclaje de AMPAR se afecta en presencia de dynasore, un bloqueador de la actividad GTP-asa de las dinaminas (Zheng et al., 2015). **Esto último, fuertemente sugiere que bajo actividad neuronal, la actividad catalítica de las dinaminas es un regulador clave del tráfico de AMPAR y de los mecanismos sinápticos que dependen de él.** Respecto de la inserción de AMPAR en las PSDs, algunos informes sugieren que ésta procede vía una exocitosis directa del receptor en las PSDs durante la LTP (Gerges et al., 2006; Kopec et al., 2006). Sin embargo, la mayoría de las evidencias sugieren que la inserción de AMPAR en la post-sinapsis ocurre primero extra-sinápticamente en el eje dendrítico, seguido de una difusión lateral desde el eje dendrítico hacia las espinas (Ashby et al., 2004; Groc et al., 2004; Yudowski et al., 2007). En 2009, Jaskolski y sus colaboradores informaron que la interrupción de la actividad GTP-asa de dinamina-2 con dynasore o con el mutante dominante negativo K44A inhibe la difusión lateral de AMPAR desde el eje dendrítico a las espinas (Jaskolski et al., 2009). Esto último, sugiere que

dinamina-2, además de su rol en la internalización y reciclaje de AMPAR, también podría jugar un importante rol en la inserción de AMPAR en las PSDs (Jaskolski et al., 2009). Además, como dinamina-2 participa activamente en las vías de reciclaje endosomal (Nicoziani et al., 2000; Van Dam & Stoorvogel, 2002) también podría regular el direccionamiento de AMPAR a las PSDs a través de la modulación de la exocitosis desde los REs, aunque esto es aún poco claro (Figura 1).

Figura 1. Rutas del tráfico de AMPAR en la densidad postsináptica. Los AMPAR se ensamblan en el retículo



endoplásmico y el aparato de Golgi (en el soma y en dendritas), desde donde trafican hacia la espina y a la densidad post-sináptica de un modo dependiente de la red de microtúbulos y del citoesqueleto de actina. Una vez allí los AMPARs están sujetos a un reciclaje constitutivo vía endosomas. La internalización de los receptores mediante endocitosis mediada por clatrina requiere de la actividad GTP-asa de dinamina-2. Una vez endocitados, los AMPAR pueden volver a la membrana plasmática a través de los endosomas de reciclaje o ser enviados a degradación

lisosomal vía endosomas tardíos. En todos estos estadios podría participar dinamina-2 y son potenciales puntos defectuosos en tejidos donde se expresan las mutaciones causantes de MCN. Un tráfico de AMPAR aberrante podría llevar a defectos en la plasticidad sináptica y consecuentemente a alteraciones en el aprendizaje y la memoria. Los procesos destacados en los rectángulos rojos son potenciales sitios de acción de dinamina 2 que podrían verse afectados por las mutaciones causantes de MCN impactando finalmente en la disponibilidad de los receptores en las densidades postsinápticas. (Figura adaptada de Anggono y Huganir, 2012).

Mutaciones en dinamina-2 y Miopatía Centronuclear (MCN)

Dinamina-2 y todas las dinaminas clásicas están compuestas por cinco dominios conservados: un dominio G (GD) catalítico capaz de unir e hidrolizar GTP ubicado en la porción amino-terminal, un dominio medio requerido para el auto-ensamblaje de dinamina (MD), un dominio de homología a pleckstrinas (PHD) capaz de unir fosfoinositidos, un dominio efector de la actividad GTPasa (GED) y un dominio rico en prolinas y argininas (PRD) ubicado en el carboxi-terminal que se une a proteínas que contienen dominios SH3 (Arriagada-Díaz et al., 2020; S. M. Ferguson & De Camilli, 2012; González-Jamett et al., 2014a; González-Jamett, Momboisse, Haro-Acuña, et al., 2013; Praefcke & McMahon, 2004) (Figura 2A). Tres hélices localizadas sobre el N- y C-terminal del GD junto con una hélice del C-terminal del GED forman el bundle signaling element (BSE) (Chappie et al., 2009). Hélices del MD y la porción amino-terminal de GED constituyen la región stalk (Antonny et al., 2016; Arriagada-Díaz et al., 2020; Chappie et al., 2009) (Fig. 2A). El BSE parece detectar y generar cambios conformacionales dependientes de la hidrólisis de GTP desde el GD a la región stalk, controlando la actividad catalítica de las dinaminas (Chappie et al., 2009). A su vez, dependiendo de la información recibida desde el BSE, la región stalk regula la oligomerización de dinamina (Wenger et al., 2013). En este sentido, la región stalk de los monómeros vecinos interactúan en una extensa interfase (interfase 2) formando un dímero en forma de cruz con sus GD asociados a un lado de la cruz y PHD vinculados al otro lado (Chappie

et al., 2011; Faelber et al., 2011) (Figura 2B). En ausencia de lípidos, las dinaminas existen predominantemente como tetrámeros, que también son estabilizados a través de la interacción de sus regiones stalk (interfases 1 y 3). Mientras la interfase 1 está en el ápice de la región stalk, interactuando proximal al GD y al BSE, la interfase 3 se encuentra en el extremo próximo a la región stalk mirando hacia la membrana distal (Chappie et al., 2011; Faelber et al., 2011; Ford et al., 2011; Kong et al., 2018) (Figura 2B). En presencia de lípidos, las dinaminas forman estructuras de alto orden en forma de hélices y anillos (Hinshaw & Schmid, 1995), los cuales aumentan la actividad GTP-asa de las dinaminas hasta 100 veces (Warnock & Schmid, 1996) favoreciendo la escisión y la tubulación de membranas (Antonny et al., 2016).

Mutaciones heterocigóticas localizadas en los dominios medio y PH del gen DNM2 causan **miopatía centro nuclear (MCN)** (Bitoun et al., 2005), un trastorno neuromuscular raro que se manifiesta clínicamente por mialgia, fatigabilidad, debilidad y atrofia progresiva de los músculos distales (Bitoun et al., 2005; Durieux, Prudhon, et al., 2010; Fischer et al., 2006; Jeannet et al., 2004). La mayoría de estas mutaciones ha demostrado aumentar la oligomerización de dinamina y la actividad GTP-asa basal en experimentos *in vitro* (Kenniston & Lemmon, 2010; Wang et al., 2010) aunque en el contexto celular aún no es del todo claro el efecto de las mutaciones causantes de MCN sobre la actividad catalítica de dinamina-2. En el año 2020, Hinostroza y su equipo de trabajo utilizando simuladores de dinámica molecular demostraron que la sustitución de una arginina (R) por un triptófano (W) en la posición 465, la mutación más común causante de MCN, provoca cambios en la interacción de aminoácidos vecinos que se propagan a través del oligómero de dinamina-2. Estas nuevas interacciones perturban el contacto entre los monómeros y favorecen una conformación más “extendida” del BSE, repercutiendo en el auto-ensamblaje y en el funcionamiento de dinamina-2, y afectando su forma de conformar estructuras de mayor complejidad como hélices y anillos (Hinostroza et al., 2020).

Aunque la MCN está descrita intrínsecamente como un trastorno de la musculatura esquelética, varios reportes clínicos describen **deficiencias cognitivas manifestadas como discapacidades del aprendizaje y coeficiente intelectual limitado (Echaniz-Laguna et al., 2007; Fischer et al., 2006; Jeannet et al., 2004) en los pacientes con MCN**. Sin embargo, la relevancia de estas observaciones y los mecanismos subyacentes a una posible patología central en pacientes con MCN nunca se han estudiado.

Considerando el potencial rol de dinamina-2 en el tráfico de receptores AMPA hacia y desde las PSDs es factible suponer que éste es un mecanismo afectado en sinapsis centrales de pacientes con MCN lo que podría desencadenar defectos en la transmisión y plasticidad sináptica excitatoria y explicar, al menos en parte, las alteraciones cognitivas observadas en esos pacientes.

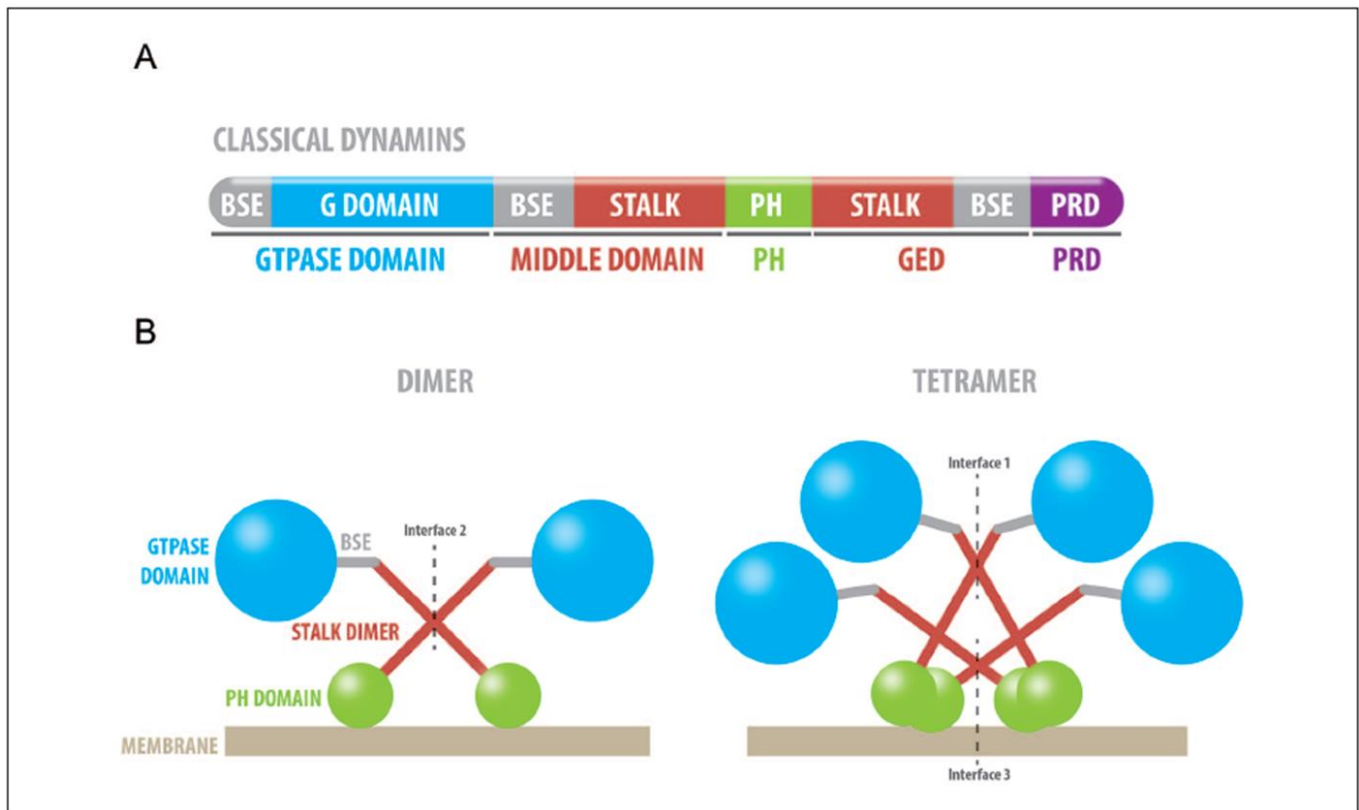


Figura 2. Organización estructural y funcional de Dinamina-2. **A)** Dinamina-2 está compuesta por 5 dominios altamente conservados, un **Dominio (GD)** que une e hidroliza GTP, un **dominio medio (MD)** estructural necesario para el auto-ensamblaje de dinamina y que se ha descrito también une actina, un **dominio de homología a pleckstrina (PHD)** que se une a fosfolípidos, un **dominio efector de su actividad GTP-asa (GED)** y un **dominio rico en prolinas y argininas (PRD)** que une moléculas con dominio SH3. La mutación **p.R465W** causante de MCN está localizada en el dominio medio de dinamina-2, **B)** Representación esquemática de dímeros y tetrámeros que muestran las interfaces necesarias para la oligomerización de dinamina-2 (Figura adaptada de Arriagada-Díaz et al., 2020).

Pregunta de investigación

Considerando la evidencia anterior es posible suponer que en condiciones patológicas en las que la actividad de dinamina-2 está afectada, el tráfico de AMPAR y consecuentemente la transmisión y plasticidad sináptica excitatoria también podrían verse afectados. De hecho, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la inhibición farmacológica de la actividad GTP-asa de las dinaminas, utilizando dynole 34-2, disminuye significativamente la potenciación a largo plazo en rebanadas hipocampales de cerebros de ratón adulto (Arriagada-Díaz et al., 2020), lo que fuertemente sugiere que la actividad catalítica de las dinaminas juega un papel crítico en la plasticidad sináptica excitatoria (Figura 3). Por lo tanto, mutaciones que afectan el funcionamiento de estas GTP-asas, podrían llegar a repercutir en la transmisión y plasticidad sináptica, conduciendo a un deterioro en las funciones cognitivas de individuos portadores de esas mutaciones como se ha descrito en pacientes que sufren MCN. De esta manera, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Mutaciones en dinamina-2 causantes de MCN podrían afectar la transmisión y plasticidad sináptica excitatoria modulando negativamente las funciones cognitivas de ratones portadores de la mutación p.R465W?

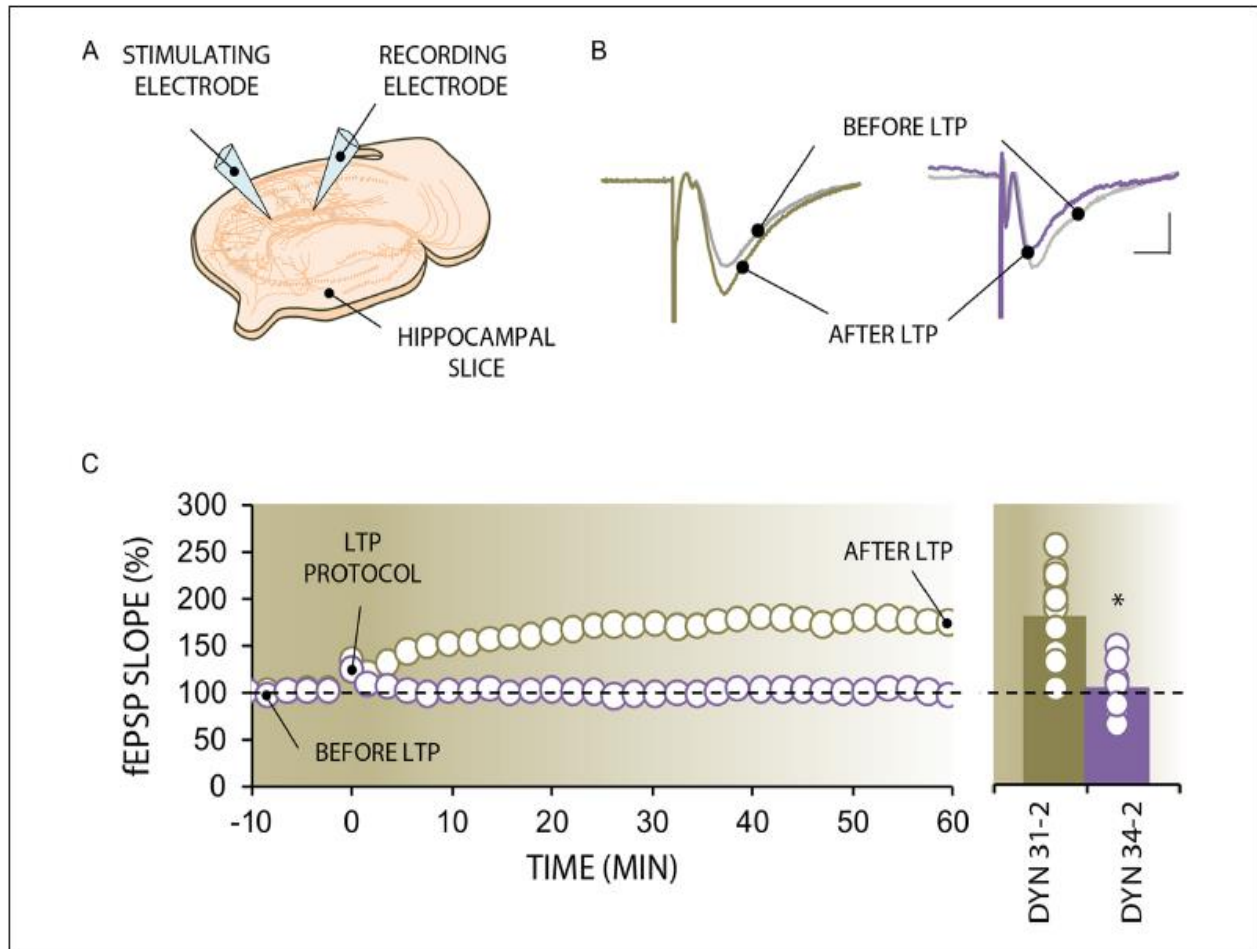


Figura 3. La inhibición farmacológica de la actividad GTPasa de dinamina disminuye la potenciación a largo plazo (LTP) de la respuesta sináptica en rebanadas hipocámpales de ratones adultos. (a) Diagrama representativo de la configuración experimental utilizada para obtener registros de campo de las respuestas excitatorias postsinápticas en cortes de hipocampo de ratones de tipo salvaje de 6 meses de edad. El electrodo de estimulación se colocó sobre las colaterales de Schaffer, mientras que el electrodo de registro se colocó en *stratum radiatum*. La estimulación fue provocada por un protocolo theta-burst (TBS) para inducir LTP. Los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) se registraron en la sinapsis colateral de Shaffer-CA1 durante 60 minutos después de inducido el TBS. El tratamiento con dynole 34-2 (Dyn 34-2) y su análogo inactivo dynole 31-2 (Dyn 31-2) se añadió 10 minutos antes, durante y después de la aplicación del protocolo de LTP. **(b)** Trazos representativos Dyn 31-2 (marrón claro) y Dyn34-2 (violeta) de fEPSP obtenidos antes y después de la aplicación del protocolo de LTP. **(c)** Tenga en cuenta que la presencia de Dyn 34-2 disminuye significativamente la potenciación de las

respuestas sinápticas en comparación con Dyn 31-2. Dyn 31-2 (n = 19 rebanadas, 5 ratones), Dyn 34-2 (n = 11 rebanadas, 3 ratones). Todos los datos se representan como media $\pm$ SEM. Las diferencias estadísticas se calcularon utilizando un t-test de dos colas, * p <0,0001.

Hipótesis

La mutación p.R465W afecta la función de dinamina-2 en las sinapsis excitatorias del hipocampo impactando negativamente en la transmisión sináptica basal, plasticidad sináptica y sobre las funciones cognitivas en un modelo murino de MCN

Estrategia experimental

Para abordar esta hipótesis utilizamos como modelo experimental un ratón knock-in (KI) heterocigoto para la mutación p.R465W (HTZ), localizada en el dominio medio de dinamina-2 que corresponde a la mutación más común causante de MCN (González-Jamett, Baez-Matus, et al., 2017). Este ratón recapitula todos los signos de MCN los que son evidentes a partir de los 2 meses de edad y progresan a medida que el animal envejece (Durieux, Vignaud, et al., 2010). Nuestra hipótesis se abordó mediante la realización de tres objetivos principales dirigidos a evaluar el papel de dinamina-2 y el impacto de la mutación p.R465W causante de MCN sobre: (1) la transmisión sináptica excitatoria basal, (2) la plasticidad sináptica excitatoria a corto y largo plazo y (3) el aprendizaje y memoria espacial y de reconocimiento en ratones HTZ.

Los protocolos de manejo animal utilizados a lo largo de este trabajo de tesis se enmarcan en el proyecto Fondecyt 11180731 “ROLE OF DYNAMIN-2 IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM

SYNAPSES: POTENTIAL IMPACT OF CENTRONUCLEAR MYOPATHY-CAUSING MUTATIONS ON AMPA-RECEPTOR TRAFFICKING AND EXCITATORY SYNAPTIC TRANSMISSION” el cual cuenta con la aprobación del COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO UV (CICUAL-UV) acta BEA 131-18

Objetivo General

Evaluar el rol de dinamina-2 y el impacto de la mutación p.R465W sobre la transmisión sináptica excitatoria, la plasticidad sináptica y el aprendizaje y la memoria.

Objetivos específicos

- (1) Evaluar la transmisión sináptica excitadora midiendo fEPSPs evocados en la sinapsis CA3-CA1, utilizando cortes de hipocampo de un modelo murino de CNM.
- (2) Evaluar la plasticidad sináptica excitatoria a corto y largo plazo utilizando cortes de hipocampo de un modelo murino de CNM.
- (3) Evaluar la memoria espacial y de reconocimiento en un modelo murino de CNM.

Materiales y metodología

Registros electrofisiológicos de campo

Considerando que la plasticidad sináptica en hipocampo es particularmente importante para los procesos de aprendizaje y memoria y que la forma de plasticidad sináptica más estudiada es la LTP en la sinapsis hipocampal CA3 - CA1 (Malenka & Bear, 2004), se evaluó la transmisión

sináptica excitatoria basal y la plasticidad sináptica en neuronas piramidales de rebanadas hipocampales de ratones HTZ de 6 meses o más, edad en la que el fenotipo miopático ya es evidente (Durieux, Vignaud, et al., 2010). Rebanadas hipocampales de animales wild type (WT) de la misma edad se utilizaron como control (Fig. 4).

Las rebanadas hipocampales fueron preparadas tal como se describió anteriormente en (Ardiles et al., 2014). Rápidamente los animales fueron sacrificados bajo anestesia profunda por saturación utilizando isoflurano y sus cerebros fueron removidos rápidamente luego de realizarles una craneotomía. Los cerebros fueron seccionados en dos hemisferios retirando el hipocampo para luego ser seccionado en rebanadas de 300 μm de grosor e inmersos en buffer de disección (en mM: 212.7, sacarosa 26 NaHCO_3 , 1.23 NaH_2PO_4 , 10 D-glucose, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl, 3 piruvato) y utilizando un vibratomo (Vibratome 1000 plus, Ted Pella Inc., CA, EE. UU.). Las rebanadas fueron transferidas y mantenidas durante 1 hora a temperatura ambiente en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF, en mM: 124 NaCl, 26 NaHCO_3 , 1.23 NaH_2PO_4 , 10 D-glucose, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl, 3 piruvato). Todos los registros se obtuvieron en una cámara de inmersión perfundida con ACSF ($30 \pm 0.5^\circ \text{C}$; 2 ml / min).

Transmisión sináptica excitatoria basal

La transmisión excitatoria basal se evaluó mediante el análisis de potenciales post-sinápticos excitatorios de campo (fEPSP), los cuales fueron evocados estimulando las colaterales de Schaffer (CA3 y registrando las respuestas en *stratum radiatum* en la región CA1 de hipocampo). Dicha estimulación se realizó con pulsos de 0.2 ms de duración, administrados a través de electrodos de estimulación bipolares concéntricos. Las respuestas basales se registraron utilizando la mitad de la intensidad de estimulación que induce una respuesta máxima, considerada como aquella que induce una espiga poblacional. La transmisión sináptica basal se

analizó determinando las relaciones de entrada-salida (input I/output O) de los fEPSP generados al aumentar gradualmente la intensidad de estimulación; donde la entrada correspondía a la amplitud de la volea presináptica (FV), y la salida a la pendiente inicial del fEPSP.

Plasticidad sináptica a corto plazo

La plasticidad sináptica a corto plazo se evaluó a través de un protocolo de razón de pulsos pareados (PPR). Cuando dos pulsos de estimulación son dados de forma sucesiva la respuesta post-sináptica al segundo pulso es típicamente de mayor magnitud que la primera debido a un aumento en la concentración del Ca^{2+} pre-sináptico que conduce a un aumento en la liberación de neurotransmisores (Yang et al., 1999). Por lo tanto, si es que la neurona pre-sináptica posee una mayor probabilidad de liberación entonces el primer pulso será suficiente para depletar los neurotransmisores disponibles para ser liberados y el segundo pulso producirá una respuesta de menor magnitud (menor PPR). Por el contrario, si la neurona pre-sináptica posee una menor probabilidad de liberación entonces el primer pulso sólo liberará una fracción de los neurotransmisores disponibles y el segundo producirá una PPR mayor. Es decir, el valor de PPR en un intervalo de estimulación dado, es inversamente proporcional a la probabilidad de liberación y cambios asociados a este parámetro dan cuenta de fenómenos pre-sinápticos. El PPR se obtuvo utilizando diferentes intervalos entre estímulos en un rango entre 25-300 ms y se estimó un índice PPR dividiendo la amplitud de la segunda respuesta por la primera (Ardiles et al., 2014).

Plasticidad sináptica a largo plazo

Potenciación a largo plazo (LTP)

Para evaluar la potenciación a largo plazo (LTP), las rebanadas fueron sometidas a un protocolo eléctrico de alta frecuencia o a un protocolo de estimulación química, con el fin de evaluar cambios en la eficacia sináptica luego de dichas estimulaciones. La potenciación a largo plazo utilizando estimulación eléctrica de alta frecuencia se realizó mediante un protocolo estándar de tipo theta burst (TBS), el cual consta de 4 trenes a 100 Hz durante 1 min (Flores-Muñoz et al., 2020; Gajardo et al., 2018). Por otro lado, la LTP química (chLTP), fue inducida mediante la perfusión de una solución de glicina (Gly 600 μ M + PTX 50 μ M + Stric 3 μ M) (X. Y. Zhang et al., 2014), directamente sobre las rebanadas de hipocampo durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de aplicación de la solución, esta fue removida y el buffer de registro fue reemplazado por uno nuevo. En ambos casos, tanto para la LTP eléctrica como para la LTP química, las pendientes de los fEPSP fueron registradas durante 20 minutos previos a la estimulación y durante 50 minutos luego de la aplicación del estímulo eléctrico (TBS) o la aplicación del estímulo químico.

Depresión a largo plazo (LTD)

Para evaluar la depresión a largo plazo (LTD), se utilizaron protocolos eléctricos de baja frecuencia y protocolos químicos (chLTD). La depresión eléctrica, fue inducida por un protocolo estándar de baja frecuencia (LFS), el cual consta de una estimulación de 1 Hz durante 15 minutos (Gajardo et al., 2018). Por otro lado, para la inducción química de la depresión a largo plazo (chLTD), las rebanadas fueron perfundidas durante 5 minutos con 30 μ M NMDA (Ardiles et al., 2014), una vez transcurrido el tiempo de aplicación de la droga, esta fue removida y el buffer de

registro fue reemplazado por uno nuevo. En ambos casos, tanto para la LTD eléctrica como para la chLTD, las pendientes de los fEPSP fueron registradas durante 20 minutos previos a la estimulación y durante 60 minutos luego de la aplicación del estímulo eléctrico (LFS) o la aplicación del estímulo químico.

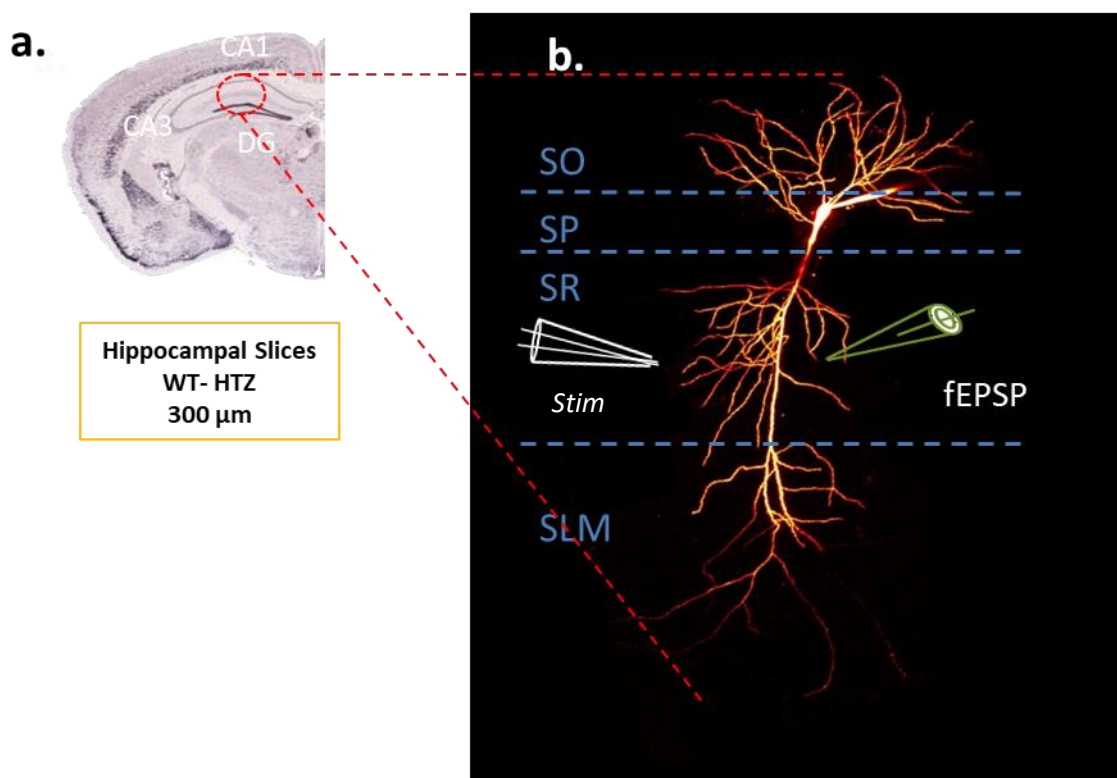


Figura 4. Representación esquemática de la configuración experimental. **a)** rebanadas hipocámpales de 300 μ m obtenidas luego de realizar la craneotomía, **b)** configuración experimental utilizada para la obtención de registros electrofisiológicos, note que tanto el electrodo de estimulación como el de registro, están posicionados en *stratum radiatum* para la obtención de fEPSP.

Experimentos conductuales para evaluación del aprendizaje y memoria

Ya que estudios clínicos sugieren que pacientes con MCN, y en particular pacientes portadores de la mutación p.R465W, presentan trastornos del aprendizaje (Jeannet et al., 2004) evaluamos las habilidades de aprendizaje y memoria en ratones HTZ y su contraparte WT. Específicamente aplicamos el test Novel Object Recognition (NOR) y el test de Barnes maze (BM), ambos tests ampliamente utilizados para evaluar las funciones cognitivas en ratones. Mientras la prueba de NOR es utilizada para evaluar la memoria de reconocimiento (Ennaceur & Delacour, 1988), BM es utilizado para medir la capacidad de aprendizaje y la memoria espacial (Sukoff Rizzo & Crawley, 2017).

Todos los tests conductuales fueron realizados en una pieza acondicionada para ello, con T° constante (21° +/- 2°C), con un ruido blanco (50 dB) y luminosidad regulada (200 lux).

Novel Object Recognition (NOR)

La prueba de NOR se basa en la tendencia espontánea de los roedores a pasar más tiempo explorando un objeto nuevo que uno familiar. Los ratones WT y HTZ fueron sometidos al test de NOR que consiste en tres fases: (i) familiarización, donde los ratones exploraron un par de objetos idénticos; (ii) retención, donde se retiraron los ratones para la limpieza y el cambio de objetos; y (iii) reconocimiento, donde los ratones exploraron un par de objetos diferentes: un objeto familiar (FO) y un objeto nuevo (NO). Para la realización de la prueba se utilizó una caja cuadrada de acrílico blanco de 50 cm x 40 cm x 63 cm en la cual los ratones exploraron libremente.

- (i) Fase de familiarización: 24 horas después de que los ratones fueran habituados a la sala donde se realizó la prueba conductual, se colocaron dos objetos idénticos en la

plataforma de acrílico, a 5 cm de las paredes. El par de objetos fue el mismo entre cada ratón y cada grupo de ensayo (WT y HTZ). El ratón fue colocado en la plataforma con la cabeza colocada en dirección opuesta a los objetos y se dejó explorar libremente durante 5 min (Fig. 5a)

- (ii) Fase de retención: Luego de realizar la fase anterior, los ratones fueron retirados de la plataforma de prueba y fueron dejados en sus jaulas de prueba durante 1 hora.
- (iii) Fase de reconocimiento: Finalmente en la fase de reconocimiento, se volvieron a colocar objetos en la plataforma de acrílico, pero esta vez uno familiar (utilizado en la fase de familiarización) y un objeto nuevo. Estos objetos fueron colocados en el mismo lugar, a 5 cm de las paredes. La posición del objeto novedoso (izquierda o derecha) fue asignado al azar a cada ratón y a cada grupo ensayado. El ratón se depositó en la plataforma de ensayo y se dejó que se comportara libremente durante 5 min de exploración (Fig. 5b). Finalizado este tiempo, los ratones fueron retornados a sus jaulas.

Todas las fases anteriormente descritas fueron repetidas durante 3 días seguidos con una sesión diaria en la cual los ratones exploran la superficie de acrílico libremente por 5 min con pares de objetos distintos por día.

Para determinar la memoria de reconocimiento de objetos, se estimó un **índice de reconocimiento (D1)**, el cual se calculó como:

$$D1 = \textit{Tiempo de exploracion sobre NO} - \textit{Tiempo de exploracion sobre FO}$$

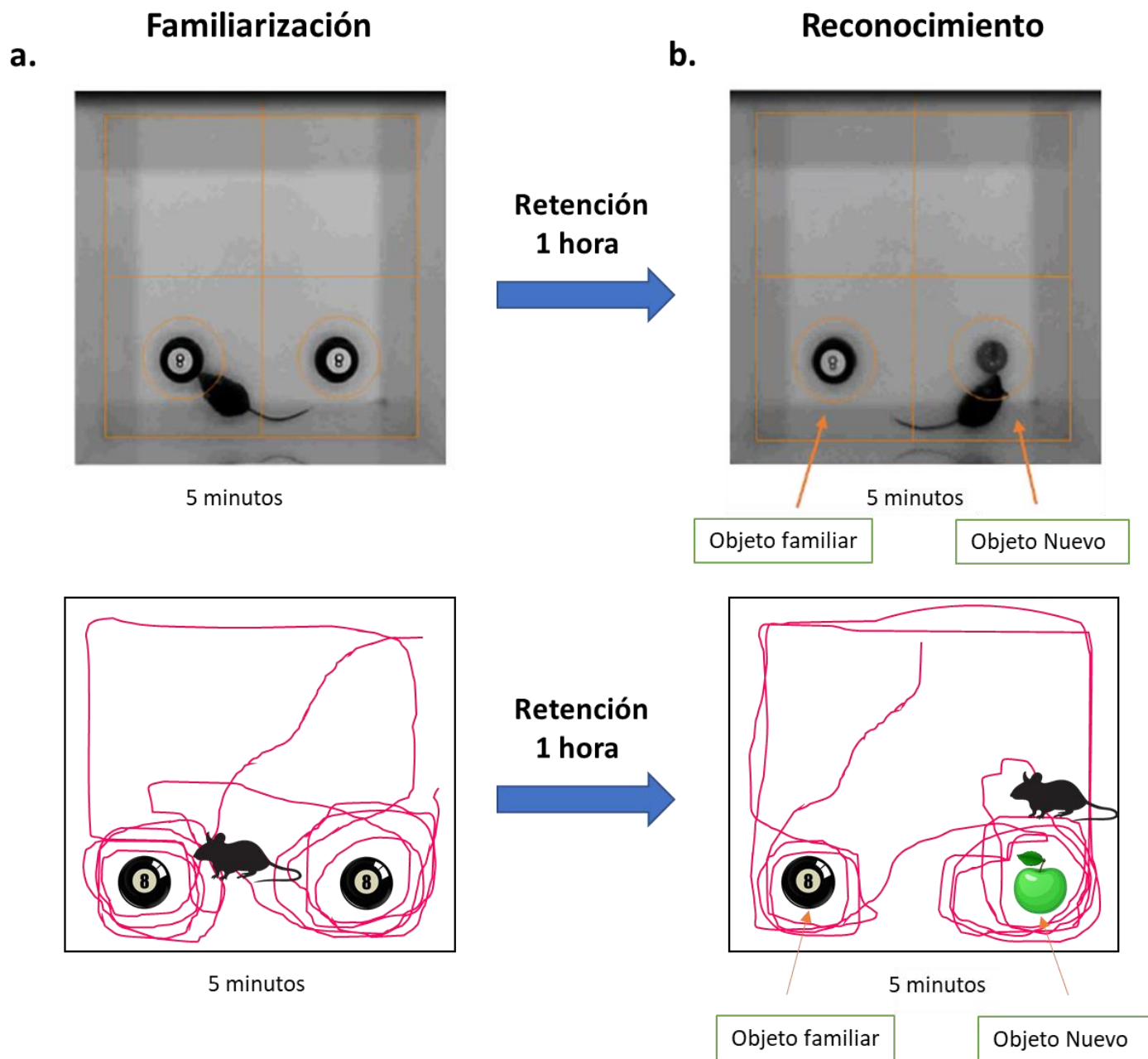


Figura 5. Laberinto utilizado en la prueba conductual NOR. a) laberinto utilizado para la prueba de NOR donde se muestra la fase de familiarización, note la utilización de dos objetos idénticos al momento de realizar la fase, en la parte inferior se muestra la trayectoria hecha por uno de los ratones que participo en el test, **b)** laberinto utilizado en el test NOR donde se muestra la fase de reconocimiento, note la presencia de un objeto idéntico a la fase de familiarización y un objeto nuevo, en la parte inferior se muestra la trayectoria realizada por uno de los ratones participantes del test

Barnes Maze (BM)

Para evaluar la memoria espacial y la capacidad de aprendizaje en ratones HTZ se utilizó el test BM (Gawel et al., 2019; Negrón-Oyarzo et al., 2015; Pitts, 2018). En esta prueba, el animal debe aprender y recordar la ubicación de una caja de escape en un campo abierto circular ansiogénico, elevado e iluminado (Barnes, 1979). El laberinto consiste en una plataforma circular blanca de 70 cm de diámetro elevada a 90 cm del piso con 20 agujeros igualmente espaciados a lo largo del perímetro (de 7 cm de diámetro cada uno) ubicados a 2 cm del borde de la plataforma. Los animales se orientan mediante pistas espaciales ubicadas en las paredes de la habitación, con el fin de encontrar y recordar la ubicación de una caja de escape de plexiglás negro ($17 \times 13 \times 7$ cm) que se encuentra debajo de uno de los agujeros. El laberinto se iluminó con 4 luces incandescentes para producir un nivel de luz de ~ 600 lux incidiendo en la plataforma circular (Fig. 6)

El test constó de 9 días de protocolo en los cuales se llevaron a cabo tres fases: (i) fase de pre-entrenamiento, en donde los ratones son entrenados para encontrar la plataforma de escape (ii) fase de adquisición, en donde los ratones recuerdan la posición de la caja de escape ayudados de las pistas espaciales dispuestas en la habitación, (iii) fase de reversión, en donde se evalúa la flexibilidad de la memoria de los ratones, cambiando la posición de la plataforma de escape pero manteniendo la posición de las pistas espaciales de las paredes de la habitación.

- (i) Fase de pre-entrenamiento (día 1): El primer día se mantuvo al animal en el centro de la plataforma por debajo de un vaso de vidrio transparente durante 30 segundos mientras la luz estaba apagada. Transcurrido este tiempo, se encendieron las luces y el ratón fue guiado lentamente moviendo el vaso de vidrio durante 10-15 segundos al agujero target que conducía a la caja de escape. A continuación, el ratón fue dejado para que entre por si solo al agujero target durante 2 minutos. Si durante este tiempo

el ratón no lograba ingresar a agujero de escape, con la ayuda del vaso de vidrio se obligaba al ratón a hacerlo. Una vez en la caja de escape, se apagaban las luces completamente y el ratón permanecía en el escondite durante 1 minuto antes de retornar a la caja de retención.

- (ii) Fase de adquisición (días 2-5): Durante los cuatro días de la fase de adquisición, los animales fueron colocados en el interior de un vaso acrílico de color negro (12 cm de diámetro x 12,5 cm alto) en el centro de la plataforma durante 15 segundos (lo que permite que el ratón tome una dirección aleatoria cuando el vaso se levanta). Al término de este tiempo el vaso acrílico se levantó, se encendieron las luces y se dejó explorar al ratón libremente sobre la plataforma. Una vez que el ratón ingresaba a la caja de escape, se apagaban las luces y el ratón permanencia en la caja durante 1 minuto.
- (iii) Fase de reversión (días 6-9): Durante los cuatro días de la fase de reversión, la caja de escape fue colocada en uno de los cuadrantes opuestos a la posición en la que estaba dispuesta en la fase de adquisición. Cada animal fue colocado en el interior del vaso acrílico de color negro en el centro de la plataforma durante 15 segundos. Al término de este tiempo el vaso acrílico se levantó, se encendieron las luces y se dejó explorar al ratón libremente sobre la plataforma durante 3 minutos. Una vez que el ratón ingresaba a la caja de escape, se apagaban las luces y el ratón permanencia en la caja durante 1 minuto.

En todas las fases si el ratón no encontraba el agujero target y no lograba entrar a la caja de escape durante los 3 minutos, se ponía fin a la prueba. Posteriormente, el experimentador guiaba al animal a la caja de escape y lo dejaba permanecer en la caja durante 1 minuto antes de retornarlo a la caja de retención.

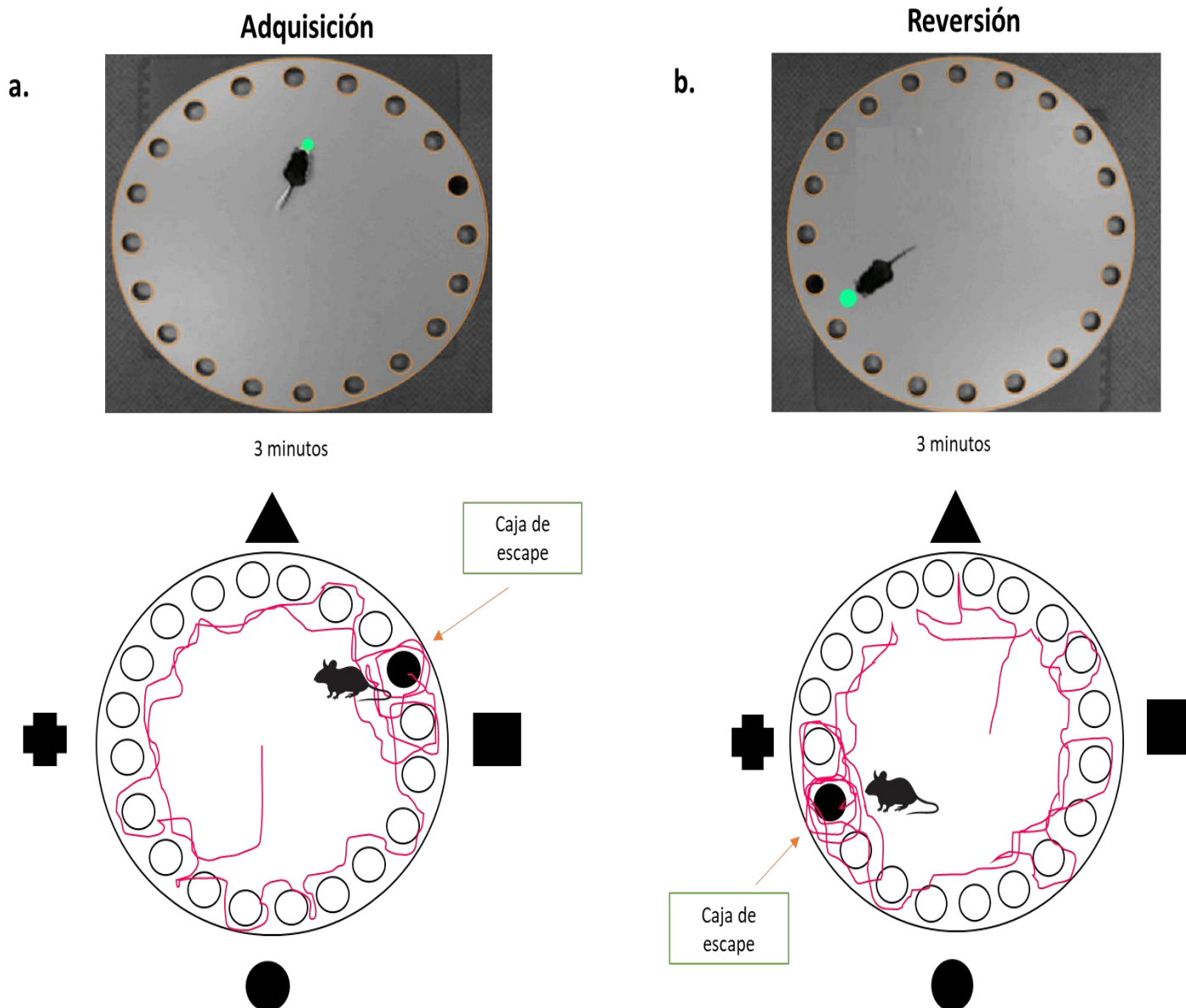


Figura 6. Laberinto utilizado en la prueba conductual BM. a) laberinto utilizado para la prueba de BM donde se muestra la fase de adquisición, note que la caja de escape se encuentra en el cuadrante superior derecho, en la parte inferior se muestra, en rosado, la trayectoria hecha por uno de los ratones que participo en el test, **b)** laberinto utilizado en el test BM donde se muestra la fase de adquisición, note el cambio de posición de la caja de escape hacia el cuadrante inferior izquierdo, en la parte inferior se muestra, en rosado, la trayectoria realizada por uno de los ratones participantes del test

Open field (OF)

Para controlar que las posibles diferencias en los test NOR y BM no se debieran a defectos en la capacidad de desplazamiento de los animales HTZ, evaluamos la actividad locomotora en los sujetos experimentales realizando un protocolo de campo abierto u open field (OF). De esta forma, cada ratón fue colocado en el centro de una caja acrílica de color blanco de 50 cm x 40 cm x 63 cm en la cual se midió la distancia total recorrida y el porcentaje de tiempo recorrido por cada uno de los animales. La prueba se realizó durante 3 días, en los cuales se midió la exploración libre del animal sobre la plataforma durante 5 minutos (Figura 7).

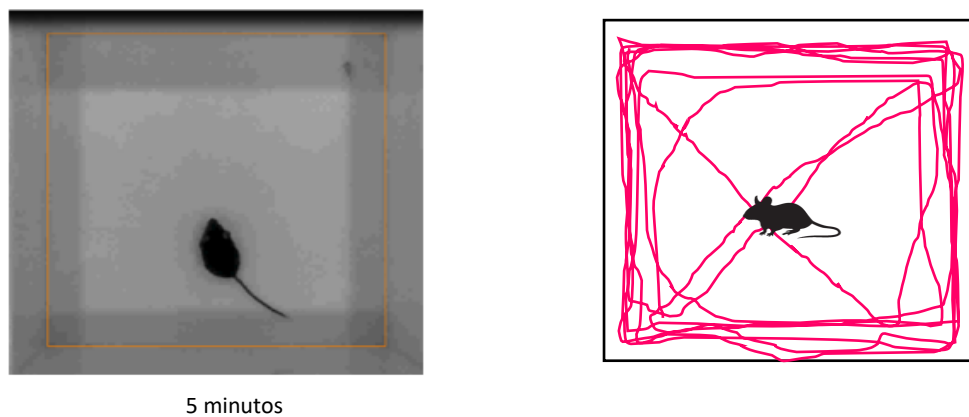


Figura 7. Laberinto utilizado en la prueba conductual de OF. (Izquierda) laberinto utilizado en la prueba conductual OF, los ratones se dejaron durante 5 minutos en la caja de prueba, donde exploraron libremente la plataforma, (derecha) se muestra, en rosado, la trayectoria realizada por uno de los ratones que participo de la prueba conductual.

Resultados

Objetivo específico 1.

Deterioro de la transmisión sináptica excitatoria basal en cerebros de ratones HTZ modelo de MCN.

Para evaluar la fuerza basal de la transmisión sináptica, evocamos potenciales post-sinápticos excitadores de campo (fEPSP) en cortes de hipocampo WT y HTZ estimulando las colaterales de Schaffer (CA3) y registrando las respuestas sinápticas en *stratum radiatum* de CA1 (Fig. 4). La relación entrada-salida (I / O) se determinó aumentando gradualmente la intensidad del estímulo. La entrada correspondió a la amplitud máxima de la volea pre-sináptica (FV) y la salida a la pendiente inicial de las fEPSP (Ardiles et al., 2014). Nuestros resultados muestran que la transmisión sináptica excitadora basal, estimada como la relación I / O, se vio significativamente afectada en rebanadas provenientes de ratones HTZ en comparación con rebanadas de hipocampo de ratones WT (Figura 8c). Interesantemente, las rebanadas de animales HTZ exhibieron pendientes de fEPSP significativamente menores (Figura 8d) pero amplitudes de FV significativamente mayores (Figura 8e) en comparación con rebanadas hipocampales de individuos WT. Esto último podría sugerir que, ante una capacidad de respuesta post-sináptica reducida, se podrían estar reclutando más axones para mejorar la liberación de neurotransmisores, como mecanismo compensatorio.

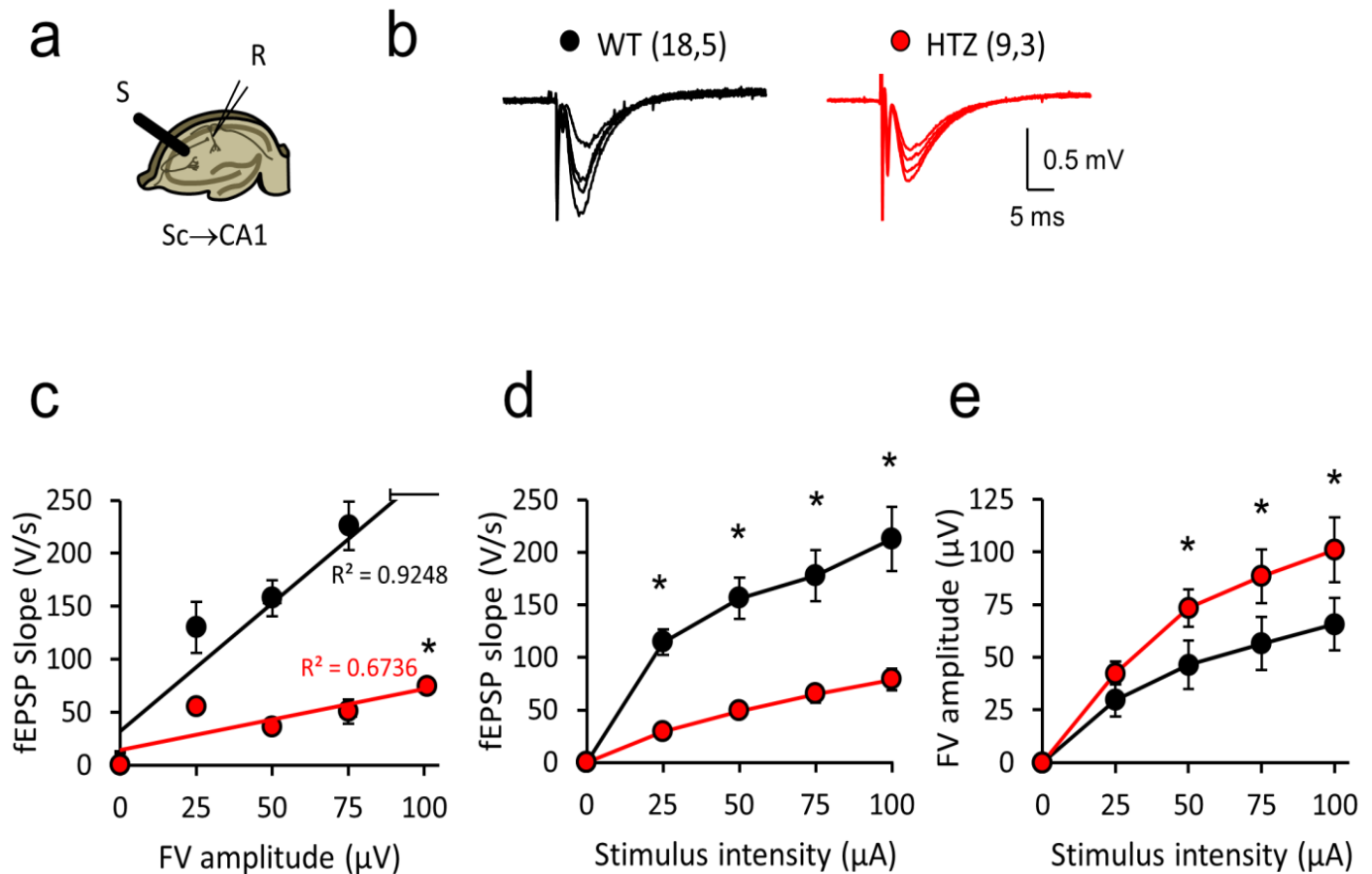


Figura 8. Deterioro de la transmisión sináptica excitatoria basal en rebanadas hipocámpales de ratón HTZ. **a)** Esquema de la configuración experimental para la obtención de los registros electrofisiológicos de campo, **b)** Trazos representativos obtenidos luego de estimular las rebanas de ambos grupos experimentales HTZ (rojo) y WT (negro), **c)** Relación entre los valores de pendiente de fEPSP y la amplitud de las FV obtenidos entre nuestros grupos experimentales. Se muestran los valores de R^2 para las respectivas regresiones lineales, **d)** Valores promedios obtenidos del análisis de las pendientes de ambos grupos experimentales, note la diferencia significativa de fEPSP a medida que se aumentaba la intensidad de estimulación entre rebanadas WT y HTZ, **e)** Valores obtenidos de FV para ratones WT y ratones HTZ, note la diferencia significativa en la amplitud de FV a medida que se aumentaba la intensidad de estímulo. (WT: $n = 8$ rebanadas, 2 ratones; HTZ: $n = 18$ rebanadas, 3 ratones). Todos los datos se representan como media $\pm$ SEM. Las diferencias estadísticas se calcularon utilizando un t-test, * $P < 0,0001$, en comparación con la condición WT.

Objetivo Especifico 2.

Plasticidad sináptica a corto plazo

Con el fin de evaluar la contribución pre-sináptica a los defectos observados en rebanadas hipocampales HTZ, estimamos la razón por pulsos pareados (PPR). Como se muestra en la Figura 9, el PPR se mantuvo sin cambios entre las rebanadas de hipocampo HTZ y WT (Figura 9), lo que sugiere que, aunque mecanismos pre-sinápticos podrían verse afectados en el contexto de la MCN, éstos parecen ser independientes de la probabilidad de liberación.

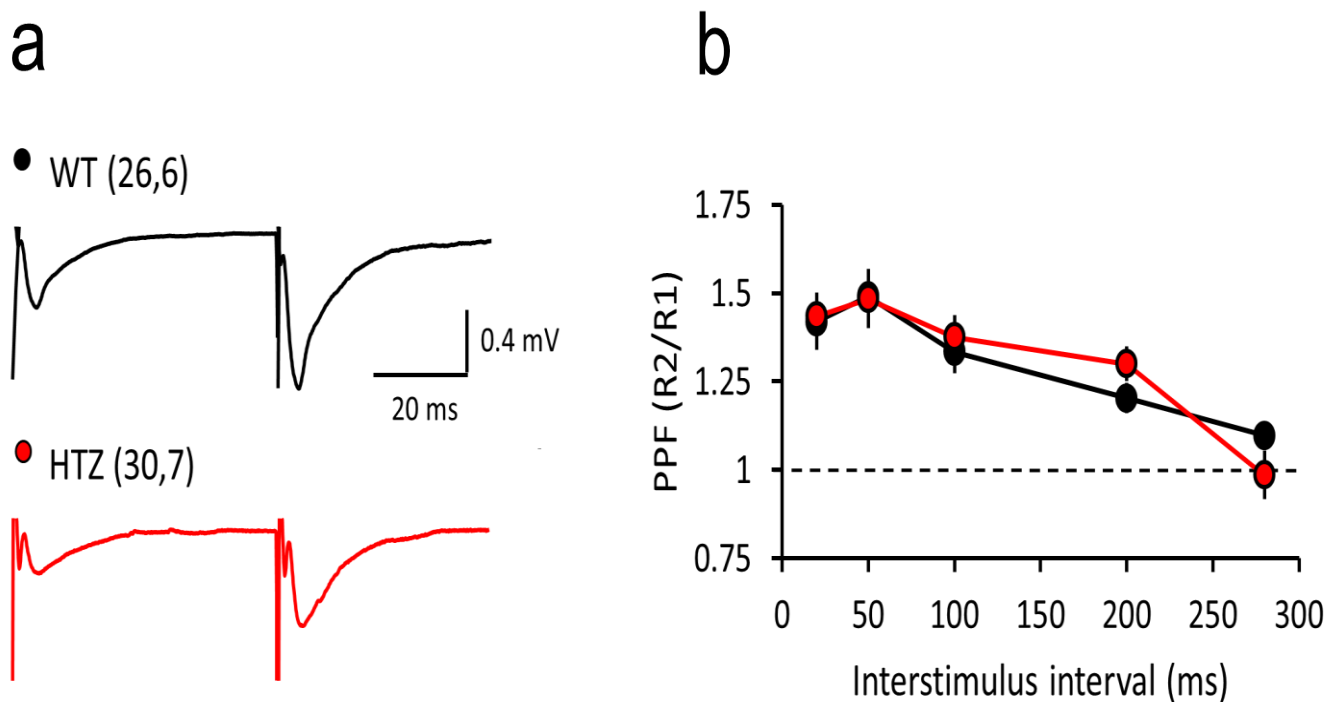


Figura 9. Plasticidad a corto plazo, Razón por pulsos pareados a) trazos representativos luego de estimular las rebanadas de ambos grupos experimentales HTZ (rojo) y WT (negro), con dos estímulos de la misma intensidad

separados por un tiempo de 50 ms, note que la amplitud de la segunda respuesta es mayor a la primera, **b)** Facilitación por pulsos pareados a distintos intervalos de estimulación. Note que no se observan diferencias significativas entre los grupos experimentales (WT: n = 26 rebanadas, 6 ratones; HTZ: n = 30 rebanadas, 7 ratones). Todos los datos se representan como media $\pm$ SEM. Las diferencias estadísticas se calcularon utilizando un t-test, * P <0,0001, en comparación con la condición WT.

Deterioro de la plasticidad sináptica a largo plazo en cerebros de ratones HTZ modelo de MCN.

Para evaluar si la plasticidad de la fuerza sináptica también se ve afectada en el contexto de MCN, se indujo una LTP dependiente de NMDAR en rebanadas de hipocampo WT y HTZ mediante el uso de un protocolo estándar de estimulación de alta frecuencia (TBS). Este protocolo genera una LTP que involucra mecanismos pre-sinápticos y post-sinápticos (Bayazitov et al., 2007). Mientras que la inducción de la LTP se basa en la activación de NMDAR, los cuales requieren de la liberación de glutamato pre-sináptico y la despolarización de la membrana post-sináptica (Citri & Malenka, 2008), la expresión y el mantenimiento de la LTP se basan principalmente en el tráfico de AMPAR hacia las PSDs (Anggono & Huganir, 2012). Como se muestra en la Figura 10, la magnitud de la LTP inducida por el protocolo de TBS se redujo significativamente después de 50 minutos de registro en rebanadas provenientes de ratones HTZ en comparación con rebanadas hipocampales de animales WT (Figura 10 a-c), lo que sugiere que dinamina-2 juega un papel importante en la mantención de la LTP inducida por TBS. Además, la potenciación temprana de la respuesta sináptica medida durante los primeros 5 minutos después de la aplicación del protocolo de TBS también se redujo en rebanadas provenientes de ratones

HTZ en comparación a rebanadas provenientes de ratones WT (Figura 10 b), lo que sugiere que la inducción de LTP también depende de dinamina-2.

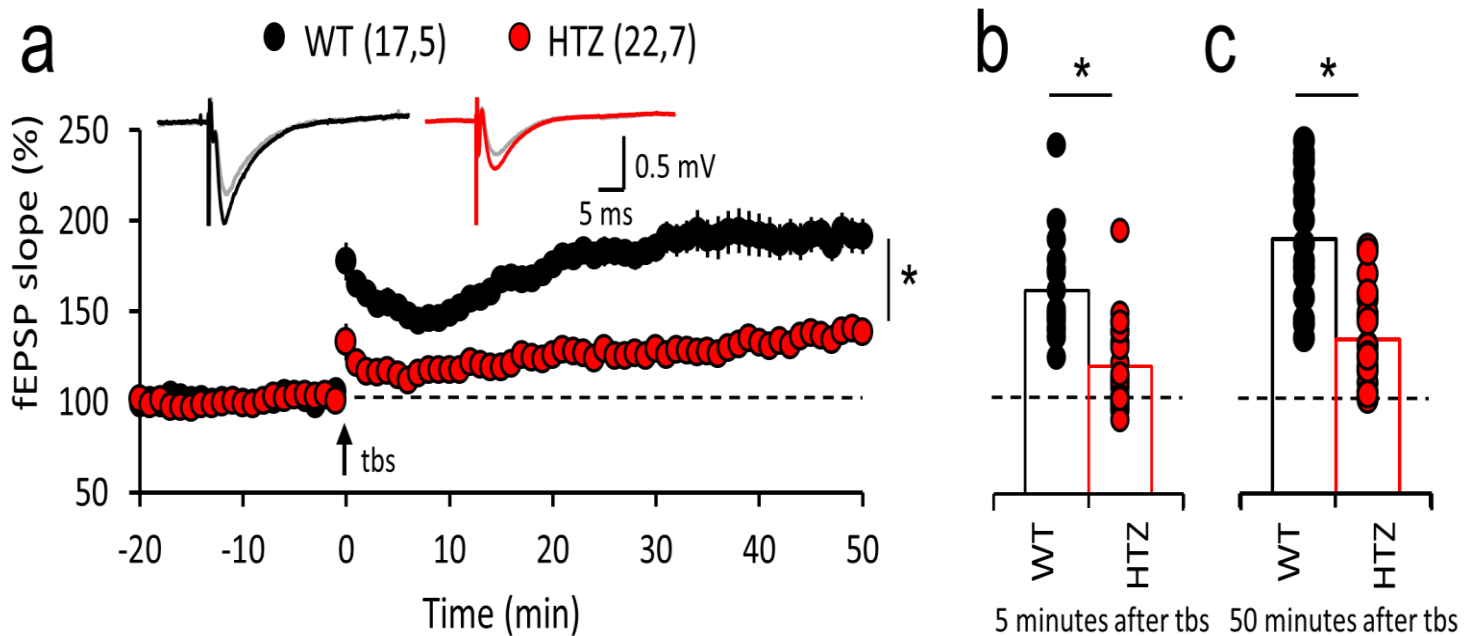


Figura 10. Deterioro de la LTP inducida por TBS en rebanadas hipocampales de ratón HTZ. a-c) Se estimularon cortes de hipocampo de ratones WT de 6 meses (círculos negros) y HTZ (círculos rojos) con un TBS para inducir LTP y se registraron potenciales de campo postsinápticos excitadores (fEPSP). 50 min después de la aplicación del protocolo de TBS, note la disminuida potenciación al final del registro en rebanadas de hipocampo de ratones HTZ en comparación a rebanadas de ratones WT. Las diferencias estadísticas se calcularon utilizando un test Mann-Whitney, * $p < 0.0001$ en comparación a la condición WT. 2-way ANOVA, $F(1,2257) = 1414$, * $p < 0.0001$ seguido del test Bonferroni post hoc ($p < 0.05$) en comparación con la condición WT. Se muestran como inserciones los trazos representativos antes (gris) y después (negro y rojo) de la aplicación del protocolo de TBS. Note que tanto al final de los registros (c), así como después de 5 min de inducción de la LTP (b) las rebanadas provenientes de

ratones HTZ, presentaron una potenciación significativamente reducida de la fuerza sináptica en comparación con rebanadas provenientes de ratones WT. Las diferencias estadísticas se obtuvieron utilizando un test de Mann-Whitney, * $p < 0,0001$ en comparación con la condición WT, luego de 5 o 50 min después del protocolo de TBS. (WT: $n = 17$ rebanadas, 5 ratones; HTZ: $n = 22$ rebanadas, 7 ratones).

Estos datos sugieren que la mutación p.R465W en dinamina-2 afecta principalmente mecanismos post-sinápticos, alterando la potenciación sináptica en respuesta a una actividad neuronal sostenida. De hecho, cuando indujimos químicamente la LTP, mediante el uso del co-agonista de NMDAR glicina (chLTP), aún pudimos observar una reducción en la magnitud de la LTP en rebanadas hipocampales del ratón HTZ en comparación con rebanadas hipocampales provenientes de ratones WT (Figura 11). Como el protocolo chLTP activa NMDAR sin mediar la liberación de glutamato pre-sináptico (W. Y. Lu et al., 2001; Musleh et al., 1997), estos resultados sugieren que los defectos inducidos por la mutación p.R465W son mayoritariamente post-sinápticos. Esto último está en acuerdo con los resultados obtenidos al aplicar nuestro protocolo de PPF, donde no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales. Estos mecanismos post-sinápticos parecen afectar principalmente a la transmisión sináptica excitatoria, ya que observamos diferencias similares entre rebanadas hipocampales de ratones HTZ y WT cuando aplicamos el protocolo de TBS en presencia de picrotoxina (PTX), un bloqueador de la transmisión inhibitoria dependiente de GABAR (Figura 12).

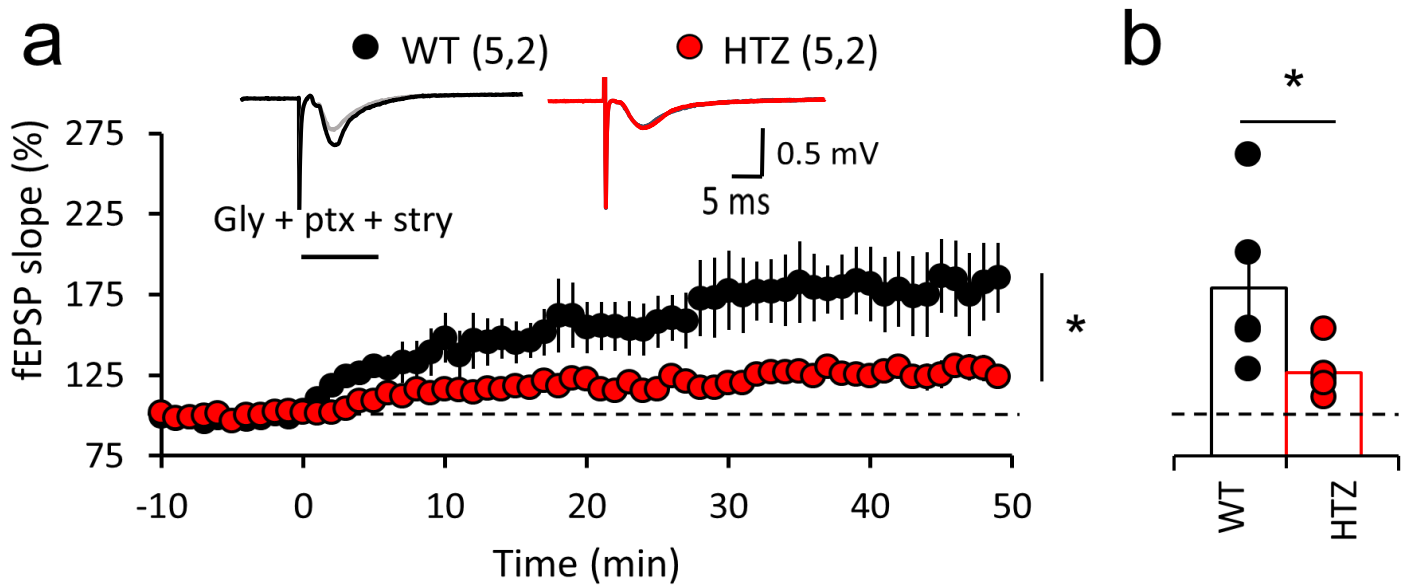


Figura 11. Deterioro de la LTP inducida por glicina en rebanadas hipocampales de ratón HTZ. a-b) Rebanadas hipocampales de ratones WT de 6 meses (círculos negros) y HTZ (círculos rojos), fueron estimuladas con la aplicación de 600 μ M glicina + 50 μ M PTX + 3 μ M estircina para inducir químicamente LTP. Se muestran como inserciones los trazos representativos antes (gris) y después (negro y rojo) de la aplicación del protocolo químico. Note que en rebanadas de hipocampo HTZ se exhibe una potenciación significativamente reducida luego de 50 min de registro **(b)** en comparación con rebanadas provenientes de ratones WT (WT: n = 5 rebanadas, 2 ratones; HTZ: n = 5 rebanadas, 2 ratones). Todos los datos se representan como media $\pm$ SEM. Las diferencias estadísticas se calcularon utilizando una prueba no paramétrica de Mann-Whitney * p < 0,05 en comparación con rebanadas WT.

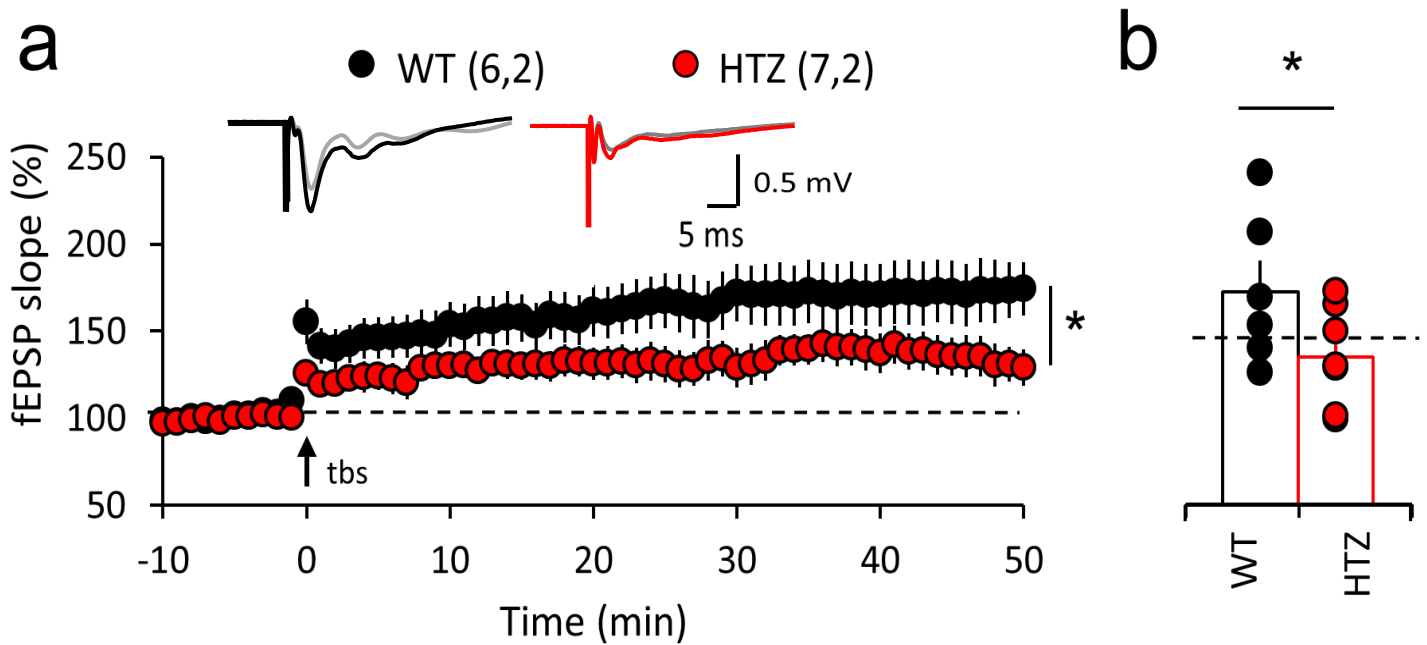


Figura 12. El deterioro de la LTP en rebanadas hipocampales de ratón HTZ, es independiente de la transmisión sináptica inhibitoria. a-b) Rebanadas hipocampales de ratones WT de 6 meses (círculos negros) y HTZ (círculos rojos), fueron estimuladas con un protocolo estándar de TBS en presencia de un inhibidor de GABAR, picrotoxina (PTX). Se muestran como inserciones los trazos representativos antes (gris) y después (negro y rojo) de la aplicación del protocolo de TBS. Note que incluso en presencia de PTX, las rebanadas de hipocampo HTZ exhiben una potenciación significativamente reducida luego de 50 min de registro **(b)** en comparación con rebanadas provenientes de ratones WT (WT: n = 6 rebanadas, 2 ratones; HTZ: n = 7 rebanadas, 2 ratones). Todos los datos se representan como media $\pm$ SEM. Las diferencias estadísticas se calcularon utilizando una prueba no paramétrica de Mann-Whitney * p <0,05 en comparación con rebanadas WT.

Al igual que la LTP, la LTD también es un fenómeno de plasticidad sináptica a largo plazo relevante para los procesos de aprendizaje y memoria (Citri & Malenka, 2008; Malenka & Bear, 2004). Teniendo esto en cuenta, evaluamos la LTD en el contexto de la MCN. La depresión de la respuesta sináptica fue evocada por la aplicación de un protocolo estándar de estimulación de baja frecuencia (LFS). Nuestros resultados muestran una reducción significativa en la magnitud y en el mantenimiento de la LTD en rebanadas hipocampales provenientes de ratones HTZ en comparación con las rebanadas hipocampales provenientes de animales WT (Figura 13). Del mismo modo, cuando la LTD fue inducida químicamente, utilizando 30 μ M de NMDA, un agonista de los receptores de NMDA, aún observamos una disminución de la magnitud y del mantenimiento de la depresión sináptica a largo plazo en rebanadas provenientes de animales portadores de la mutación p.R465W, a diferencia de su contraparte WT (Figura 14).

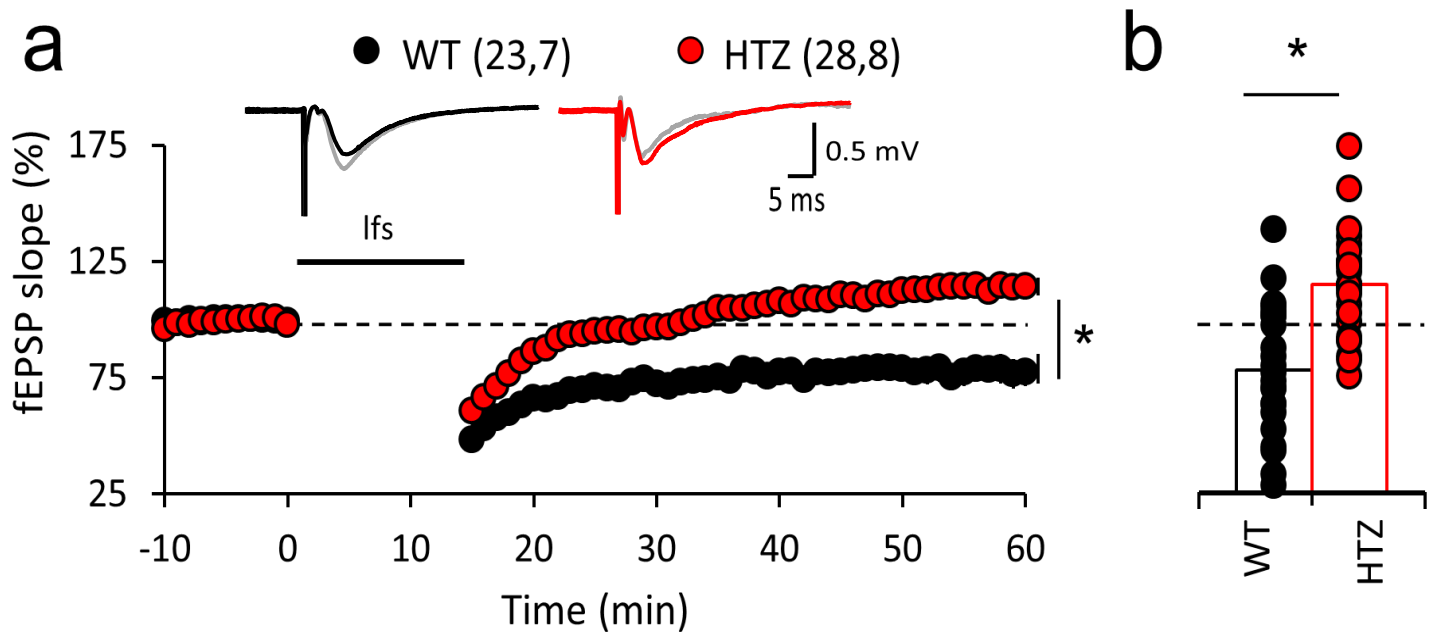


Figura 13. Deterioro de la LTD inducida por LFS en rebanadas hipocampales de ratón HTZ. **a-b)** Rebanadas hipocampales de ratones WT de 6 meses (círculos negros) y HTZ (círculos rojos), fueron estimuladas con un protocolo estándar de estimulación eléctrica de baja frecuencia (LFS), registrándose fEPSP durante 60 min para estimar la depresión de la respuesta sináptica. Note que en rebanadas de hipocampo HTZ se exhibe una depresión significativamente reducida luego de 60 min de registro **(b)** en comparación con rebanadas provenientes de ratones WT (WT: n = 23 rebanadas, 7 ratones; HTZ: n = 28 rebanadas, 8 ratones). Todos los datos se representan como media $\pm$ SEM. Las diferencias estadísticas se calcularon utilizando un test de Mann-Whitney * p < 0,05 en comparación con la condición WT.

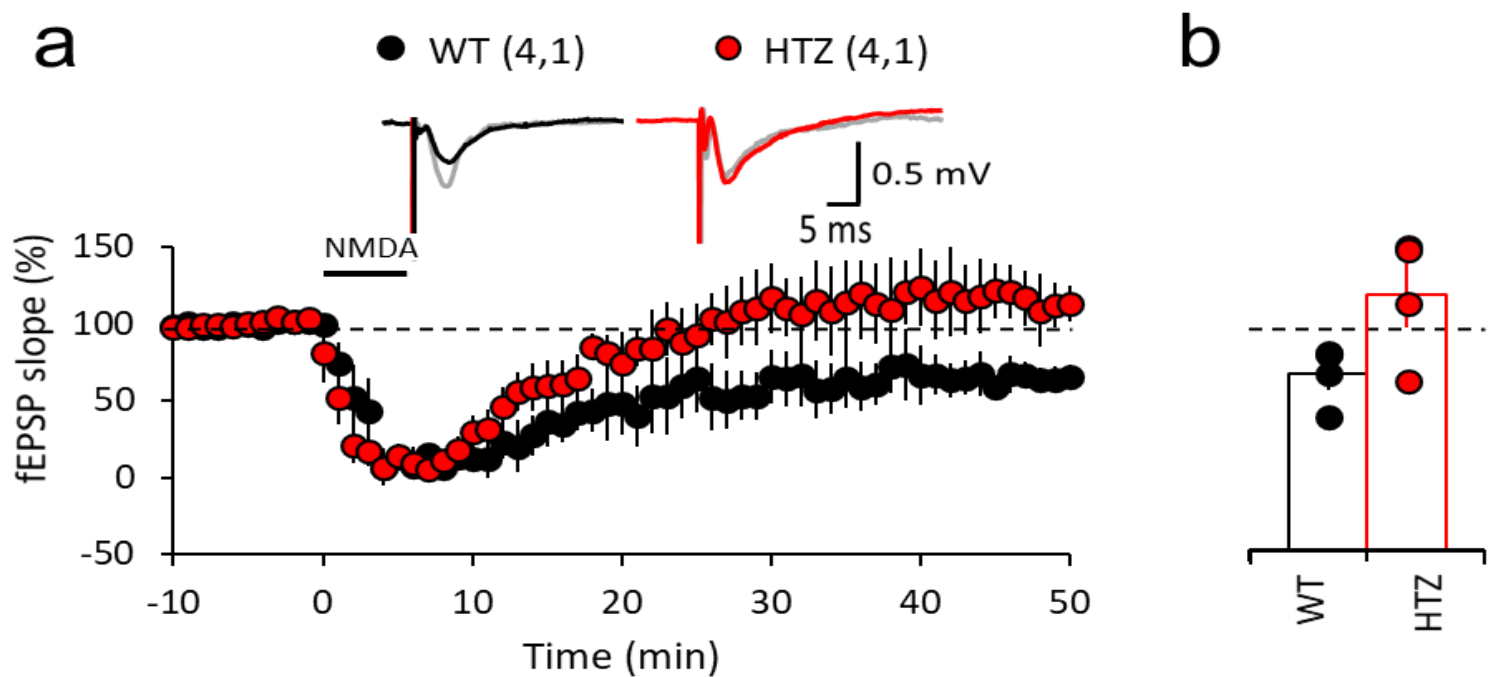


Figura 14. Deterioro de la LTD inducida por NMDA en rebanadas hipocampales de ratón HTZ. a-b) Rebanadas hipocampales de ratones WT de 6 meses (círculos negros) y HTZ (círculos rojos), fueron estimuladas con la aplicación de 30 μ M NMDA para inducir químicamente LTD. Se muestran como inserciones los trazos representativos antes (gris) y después (negro y rojo) de la aplicación del protocolo químico. Note que en rebanadas de hipocampo HTZ se exhibe una depresión significativamente reducida luego de 50 min de registro (**b**) en comparación con rebanadas provenientes de ratones WT (WT: n = 4 rebanadas, 1 ratones; HTZ: n = 4 rebanadas, 1 ratones). Todos los datos se representan como media $\pm$ SEM. Las diferencias estadísticas se calcularon utilizando un test de Mann-whitney.

Objetivo Especifico 3

Deterioro del aprendizaje y la memoria en ratones HTZ modelo de MCN

Dado que se han informado problemas de aprendizaje temprano y defectos cognitivos en pacientes con MCN ligada a DNM2 (Böhm et al., 2012; Echaniz-Laguna et al., 2007; Fischer et al., 2006; Jeannet et al., 2004), evaluamos el aprendizaje y la memoria en nuestro modelo murino de MCN.

La prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR) se basa en la tendencia espontánea de los roedores a pasar más tiempo explorando un objeto nuevo que uno familiar (Ennaceur & Delacour, 1988). Luego de la aplicación del test, nosotros cuantificamos la memoria de reconocimiento a largo plazo midiendo el tiempo que los ratones se dedicaron a explorar cada objeto y calculamos un índice de reconocimiento (D1). Como se muestra en la Figura 15, los ratones WT pasaron significativamente más tiempo de exploración sobre el objeto nuevo (N) que sobre el objeto familiar (F) a lo largo de las sesiones de entrenamiento; no obstante, animales HTZ no modificaron su preferencia entre objetos nuevos (N) y familiares (F) (Figura 15a). Además, los ratones HTZ exhibieron un índice de reconocimiento (D1) significativamente reducido en comparación con sus compañeros de camada WT (Figura 15b), lo que sugiere que existen defectos en la memoria de reconocimiento en un contexto de la MCN.

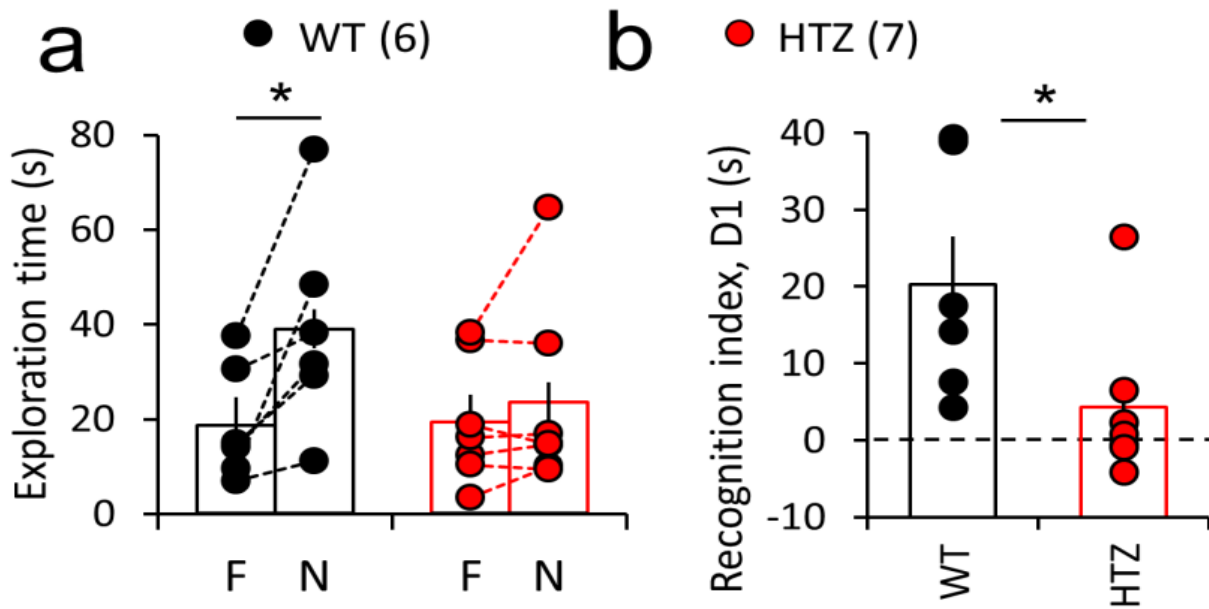


Figura 15: Ratones HTZ muestran un deterioro en la memoria de reconocimiento al ser sometidos al test NOR. a) Tiempo medio de exploración para los objetos familiares (F) y nuevos (N). Note que los ratones HTZ pasan significativamente menos tiempo explorando objetos nuevos en comparación con ratones WT. Wilcoxon test, $*p=0.0312$ en comparación a ratones WT, **(b)** Índice de reconocimiento medio (D1). Los valores positivos indican el reconocimiento del objeto nuevo por sobre el objeto familiar. Mann-Whitney test, $*p=0.0221$ en comparación a la condición WT. (WT, $n=6$; HTZ, $n=7$).

Para evaluar si la memoria de referencia espacial se ve afectada, se aplicó la prueba de BM. Esta tarea depende de la inclinación intrínseca de los roedores a escapar de un entorno aversivo (Gawel et al., 2019; Negrón-Oyarzo et al., 2015; Pitts, 2018). El rendimiento de los ratones en el test BM se cuantificó como el tiempo que tardaron los animales en entrar en la caja de escape (latencia). Como se muestra en la Figura 16, el tiempo para encontrar y entrar en la caja de escape disminuyó a lo largo de las sesiones de entrenamiento para los ratones WT y HTZ. Sin embargo, los ratones HTZ tardaron más que los ratones WT en acceder a la caja de escape durante la fase de inversión (figura 16 b). De hecho, en el último día de la fase de inversión, los ratones WT tardaron en promedio 57.3 ± 18.2 s, mientras que los ratones HTZ tardaron en promedio $100,6 \pm 20.5$ s en finalizar la prueba (figura 16c). Interesantemente, el porcentaje de ratones HTZ que completaron la prueba en el último día de la fase de inversión fue significativamente menor en comparación a los ratones WT (Figura 16d), lo que sugiere defectos en la flexibilidad de la memoria espacial.

Es importante destacar que estas observaciones no se debieron a defectos de locomoción en los ratones HTZ, ya que el porcentaje de tiempo total recorrido y la distancia total recorrida en un test de campo abierto no fueron diferentes entre ratones de ambos grupos experimentales (Figura 17).

Juntos, estos datos confirman que, al igual que en los pacientes con MCN (Böhm et al., 2012; Echaniz-Laguna et al., 2007; Fischer et al., 2006; Jeannet et al., 2004), los ratones HTZ exhiben capacidades de aprendizaje y memoria deterioradas. Tal como muestran nuestros resultados, estos defectos cognitivos se correlacionan con defectos en la transmisión y plasticidad sináptica excitatoria.

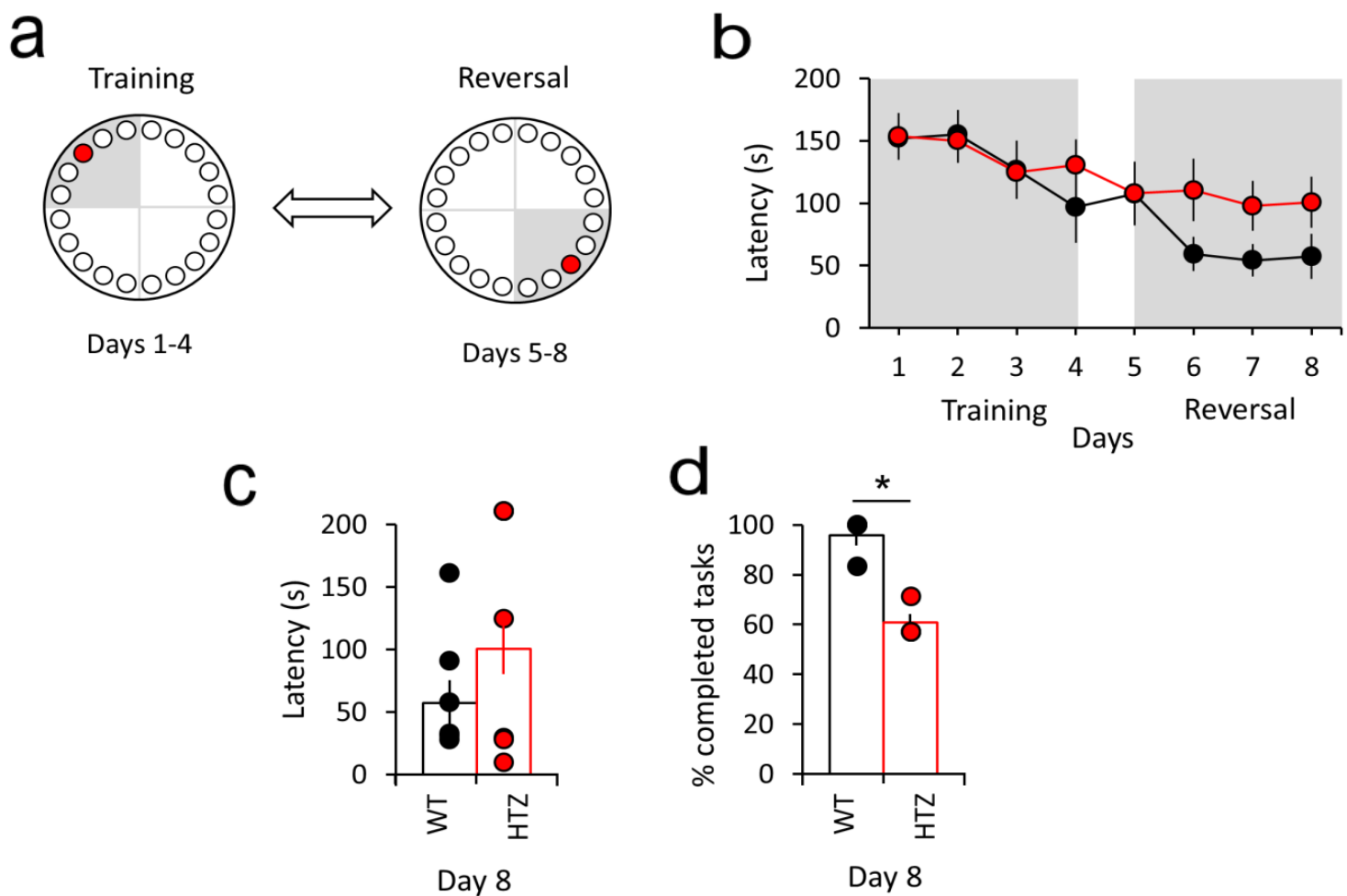


Figura 16: Ratones HTZ muestran deterioro de la memoria espacial en la prueba de BM. Se entrenaron grupos de ratones WT y HTZ de 6 meses durante 4 días (D1-D4) para encontrar y escapar a una caja oscura escondida debajo de uno de los agujeros del laberinto de Barnes, usando pistas visuales a lo largo de las sesiones (4 intentos por día). Al quinto día se inició un período de reversión (D5-D8), en el que se cambió la posición de la caja de escape oculta bajo la plataforma, manteniendo el lugar de las pistas visuales para evaluar la flexibilidad de la memoria. **(a)**, representación esquemática de la prueba de BM. **(b)**, Cuantificación de la latencia para entrar a la caja de escape a lo largo de las sesiones de entrenamiento y fase de reversa. **(c)**, Latencia media para entrar a la caja de escape el día 8 de la prueba. **(d)**, Cuantificación del porcentaje de animales que completaron la tarea el último día de la fase de

inversión. Note que el tiempo para entrar a la caja de escape no fue estadísticamente significativo, pero el porcentaje de ratones HTZ que completaron la prueba el último día de la fase de reversión fue significativamente menor en comparación a ratones WT. Mann-Whitney test, $*p = 0.0286$ en comparación con la condición WT. Todos los datos se representan como la media $\pm$ SEM (WT, $n = 6$ ratones; HTZ, $n = 7$ ratones).

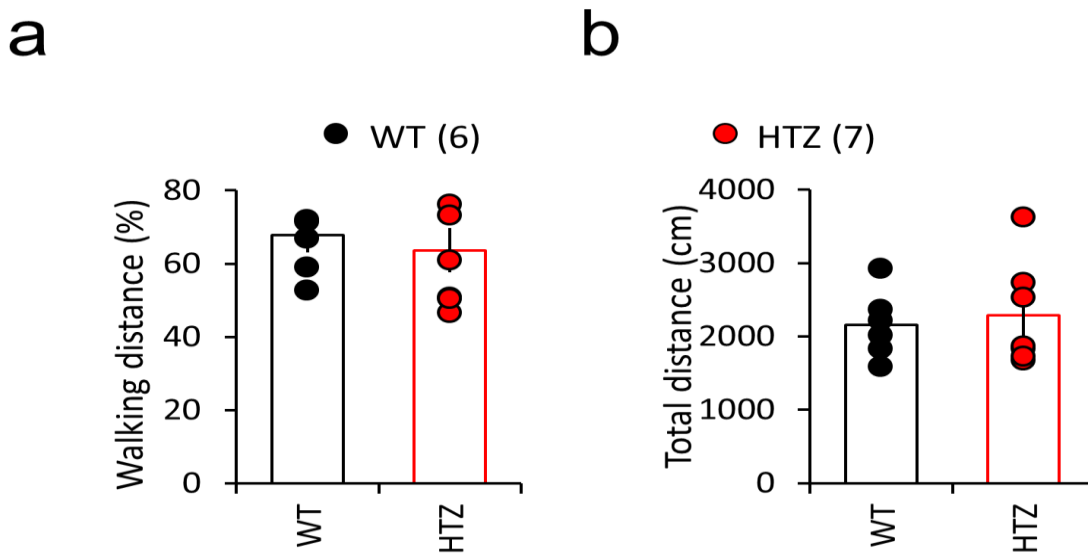


Figura 17: Ratones HTZ no muestran dificultades en el desplazamiento. Se dejaron ratones WT (círculos negros) y HTZ (círculos rojos) de más de 6 meses que exploraran libremente un campo abierto durante 5 min. **(a)**, porcentaje medio del tiempo de caminata y **(b)**, distancia total recorrida se grafican por cada grupo experimental. Todos los datos se representan como media $\pm$ SEM. (WT, $n = 6$ ratones; HTZ, $n = 7$ ratones). Las diferencias estadísticas se calcularon utilizando una prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Discusión

Dinamina-2 es una enzima con actividad GTP-asa que ha sido implicada en una variedad de funciones celulares, las cuales incluyen remodelamiento de membrana durante exocitosis, endocitosis y reciclaje de proteínas de membrana, así como organización y remodelamiento del citoesqueleto de actina (Arriagada-Díaz et al., 2020; González-Jamett et al., 2014a; González-Jamett, Momboisse, Haro-Acuña, et al., 2013; R. Zhang et al., 2020). Todas estas funciones de dinamina-2 son potencialmente afectadas por mutaciones causantes de MCN en los tejidos donde ésta se expresa. De hecho, la dinámica de actina y el tráfico de proteínas de membrana han mostrado ser procesos defectuosos en células musculares de pacientes y de un modelo animal de MCN (González-Jamett, Baez-Matus, et al., 2017). Nuestros resultados sugieren que la mutación p.R465W causante de MCN también afecta la función de dinamina-2 en las sinapsis excitatorias hipocampales, conduciendo a un deterioro de la transmisión sináptica. Así, luego de la aplicación del protocolo de input-output, logramos identificar en ratones HTZ, valores de FV significativamente mayores y valores de fEPSP significativamente menores en comparación a los obtenidos para rebanadas hipocampales provenientes de ratones WT. Esto sugiere un posible efecto compensatorio que viene a suplir el déficit de la respuesta post-sináptica, aumentando el input de la transmisión sináptica excitatoria (Figura 8).

Por otro lado, considerando que no observamos diferencias significativas en los valores de PPR, estos datos nos sugieren que es la función de dinamina-2 a nivel post-sináptico la que podría verse afectada mayormente por la mutación (Figura 9). En este sentido, una posibilidad es que la mutación p.R465W afecte el rol de dinamina-2 en el tráfico de AMPAR desde y hacia las PSDs afectando finalmente la cantidad de estos receptores disponibles para mediar la respuesta

sináptica. Considerando que los AMPAR son los principales moduladores de la transmisión sináptica excitatoria en el cerebro de mamíferos (Park, 2018) es muy probable que ese defecto en el tráfico se traduzca en defectos en la eficacia y en la plasticidad sináptica, como lo podemos observar en la disminuida capacidad de potenciación y depresión a largo plazo en rebanadas hipocampales de ratones HTZ para la mutación p.R465W (Figuras 10,11,13,14). Congruentemente con este razonamiento, nuestros resultados también muestran que los ratones HTZ exhiben defectos en el aprendizaje y consolidación de la memoria espacial y de reconocimiento durante los test de Barnes maze y Novel object recognition respectivamente, sin observarse defectos en la actividad locomotora (Figuras 15,16,17).

¿De qué manera mutaciones en dinamina-2 causantes de MCN podrían afectar la transmisión sináptica excitatoria, la plasticidad sináptica y las funciones cognitivas de ratones HTZ portadores de la mutación p.R465W?

Entre las dinaminas clásicas, las isoformas 2 y 3 son las más relevantes en la post-sinapsis (P. M. Okamoto et al., 2001) y parecen desempeñar funciones importantes en el tráfico de AMPAR. En 1999, Carroll y su equipo de trabajo, demostraron que la sobreexpresión de dinamina-2-K44A, un mutante incapaz de unir e hidrolizar GTP, perturba la endocitosis mediada por clatrina (CME) de AMPAR en neuronas del hipocampo cultivadas (Carroll et al., 1999). Este proceso ocurre en zonas endocíticas (EZ) adyacentes a las densidades postsinápticas (PSD). Dinamina-2 parece dirigir la internalización de AMPAR regulando la actividad del citoesqueleto en conjunto con la proteína Arc / Ag3.1, quien aumenta la actividad GTP-asa de dinamina-2 (Chowdhury et al., 2006). A partir de estas EZ, AMPAR se somete a procesos de clasificación endosomal que puede

llevarlos a una vía de degradación lisosomal a través de endosomas tardíos o de regreso a la membrana plasmática a través de endosomas de reciclaje (RE) (Ehlers, 2000; Park et al., 2004). En altas frecuencias de actividad sináptica, los RE se mueven hacia las espinas dendríticas permitiendo una entrega local de AMPAR (Park et al., 2006). Otra ruta del tráfico de AMPAR en la que dinamina-2 participa es la difusión lateral desde el eje dendrítico a las PSDs. En el año 2009, Jaskolki y sus colaboradores, utilizando una proteína fluorescente verde anclada a la membrana y un constructo que expresa la subunidad GluR2 de AMPAR demostraron que la inserción de AMPAR-GLUR2 se produce en el eje dendrítico y que los nuevos AMPAR difunden lateralmente hacia las espinas dendríticas de un modo dependiente de la actividad GTPasa de dinamina-2. Congruentemente, el bloqueo de la actividad GTPasa de dinamina-2 con el fármaco dynasore (Macia et al., 2006) y/o con la mutante K44A reduce la difusión lateral de AMPAR (Jaskolski et al., 2009).

Lo anterior nos hace suponer que nuestros resultados podrían explicarse por defectos en distintos estadios del tráfico de AMPAR hacia y desde las espinas, lo que conduciría potencialmente a defectos en la disponibilidad de AMPAR en las PSDs y consecuentemente a un deterioro de la respuesta sináptica excitatoria.

Un modulador importante del tráfico de AMPAR y que por cierto es regulado por la actividad de dinaminas, es el citoesqueleto de actina. De hecho, se ha demostrado que dinamina-2 organiza el remodelamiento de actina en diferentes modelos experimentales promoviendo la polimerización de actina (González-Jamett, Guerra, et al., 2017; Gu et al., 2010; Mooren et al., 2009) y modulando la estabilización de los filamentos de actina (Yamada et al., 2013). Actina actúa como un importante regulador del tráfico intracelular (Lanzetti, 2007) y en las espinas dendríticas, una rica red de actina regula la exocitosis, la endocitosis y el reciclaje de AMPAR (Hanley, 2014). Congruentemente, la alteración de la remodelación de la actina suprime la potenciación de la

transmisión sináptica (Fukazawa et al., 2003; Kim & Lisman, 1999). Las redes de actina son estructuras altamente dinámicas que actúan como los principales componentes del citoesqueleto de las espinas dendríticas (Bosch & Hayashi, 2012; Koleske, 2013; Penzes & Rafalovich, 2012). Las espinas dendríticas contienen altos niveles de actina, aproximadamente 6 veces más altos que los ejes dendríticos (Honkura et al., 2008). La actina existe en forma filamentosa polimerizada (actina filamentosa / actina F) o como forma monomérica despolimerizada soluble (actina globular / actina G). En las espinas dendríticas, la F-actina constituye la mayor proporción, mientras que la G-actina contribuye solo con aproximadamente el 12% del contenido total de actina (Honkura et al., 2008; Star et al., 2002). La estructura de la F-actina varía desde redes de filamentos ramificados hasta haces gruesos de filamentos reticulados, que brindan soporte y estabilidad a las dendritas y espinas (Blanchoin et al., 2014), y el balance entre actina F y G, permite cambios morfológicos en las espinas dendríticas durante distintos patrones de actividad neuronal. De esta manera, además de un papel funcional en el tráfico de AMPAR, la red de actina tiene un papel estructural importante que respalda las modificaciones en la arquitectura de las espinas dendríticas durante la inducción de la plasticidad sináptica (Bosch et al., 2014; Hanley, 2014). Así es como la polimerización de actina se asocia con el agrandamiento de las espinas dendríticas en una LTP (B. Lin et al., 2005), mientras que la despolimerización de actina se asocia con la contracción de las espinas dendríticas en una LTD (Fortin et al., 2012; K. Okamoto et al., 2009; Zhou et al., 2004). Aspectos tan relevantes como la morfología neuronal, así como el tamaño y la densidad de las espinas dendríticas en la post-sinapsis excitatoria son procesos críticamente dependientes de la integridad del citoesqueleto de actina (Fortin et al., 2012; Hanley, 2014) y son moduladores directos de la función sináptica excitatoria (Yan et al., 2015).

Considerando que la oligomerización y la actividad enzimática de dinamina-2 ha mostrado ser un importante regulador de la dinámica de actina (Gu et al., 2010; Mooren et al., 2009; R. Zhang et

al., 2020), dinamina-2 está potencialmente involucrada en la organización y el remodelamiento de actina a nivel de espinas dendríticas controlando la morfología de las espinas, aunque eso hasta ahora no ha sido demostrado. Considerando que mutaciones en dinamina-2 causantes de MCN producen alteraciones en la dinámica de actina en otros tipos celulares (González-Jamett, Baez-Matus, et al., 2017), es posible que la organización de actina y los procesos que dependen de ésta en tejidos sinápticos también se vean afectados en el contexto de la MCN explicando el deterioro de la transmisión sináptica excitatoria y los defectos cognitivos. De hecho, datos no publicados de nuestro laboratorio sugieren que en neuronas HTZ en cultivo teñidas con la toxina de unión a F-actina faloidina, la densidad y la morfología de las espinas dendríticas está afectada (Mattar M. & Labraña M., 2021) lo que apoya fuertemente esta idea.

Posibles implicaciones de la mutación p.R465W en dinamina-2 a nivel pre-sináptico

Los resultados de nuestros registros electrofisiológicos de campo sugieren cambios mayoritariamente post-sinápticos en el cerebro de ratones HTZ comparados con los WT. Esta idea está respaldada por el hecho de que al inducir químicamente LTP (figura 11) o LTD (figura 14), estrategia experimental en la que la plasticidad no depende de la liberación pre-sináptica de neurotransmisor, sino que directamente de la activación del receptor post-sináptico (W. Y. Lu et al., 2001), observamos los mismos defectos que al aplicar los protocolos estándar de TBS o LFS (figuras 10,13). Mas aún, ya que no hay diferencias en los valores de PPF (figura 9) los resultados sugieren que no hay cambios en la probabilidad de liberación de glutamato entre la condición WT y HTZ. Sin embargo, no podemos descartar del todo que la mutación p.R465W pueda estar afectando el funcionamiento de dinamina-2 a nivel pre-sináptico. El reciclaje

endocítico de vesículas sinápticas (SVs) que compensa la exocitosis de SVs es fundamental para mantener y garantizar la eficiencia de la neurotransmisión (Cárdenas & Marengo, 2010). La participación de las dinaminas en el reciclaje de SVs se demostró por primera vez en la unión neuromuscular del mutante de *Drosophila shibire* (Chen et al., 1991). *Shibire* es una mutación en el ortólogo de dinamina en *Drosophila* que la hace sensible a la temperatura produciendo alteraciones de la locomoción y parálisis a temperaturas no permisivas ($> 30^{\circ}\text{C}$) (Poodry & Edgar, 1979). Esto último es consecuencia de la incapacidad de dinamina en las fosas endocíticas para lograr el proceso de fisión, lo que conduce a una acumulación aberrante de estructuras en forma de omega en la zona presináptica y al agotamiento del pool de SVs en las terminales nerviosas (Koenig & Ikeda, 1989). En el año 2013, experimentos realizados en el laboratorio de Moshida demostraron que todas las isoformas de dinamina clásicas juegan un papel relevante en el reciclaje de SVs pero que su participación depende de la actividad neuronal. La eliminación específica de cada isoforma en neuronas del ganglio cervical superior de rata mostró que la reposición del pool de vesículas de liberación rápida (RRP) está mediada por dinamina-1, dinamina-2 o dinamina-3 con diferentes cinéticas, en función del patrón de disparo de los potenciales de acción (AP). En particular, dinamina-2 media el reciclaje de SVs en respuesta a una alta frecuencia de estimulación neuronal, participando rápidamente para repoblar el RRP y evitar el déficit de SVs para la mantención de la transmisión sináptica (Tanifuji et al., 2013). Esto último nos sugiere que mutaciones que afecten la función de dinamina-2, como las que causan MCN, podrían potencialmente afectar la maquinaria de reabastecimiento de las SVs y generar en consecuencia un deterioro en la transmisión sináptica. Más experimentos son necesarios para evaluar si es que el reciclaje de SVs y el pool RRP se ven afectados en los terminales sinápticos de neuronas HTZ.

¿Cómo la mutación p.R465W puede afectar la estructura y el funcionamiento de dinamina-2?

El autoensamblaje de dinamina-2 para luego formar estructuras más complejas como tetrámeros o anillos de dinamina, es crucial para su función. En experimentos *in vitro*, se ha descrito que mutaciones causantes de MCN, que afectan el DM y el PHD, aumentan la actividad GTPasa de dinamina-2. Estas mutaciones parecen causar cambios conformacionales en dinamina-2 que favorecen la formación de estructuras anulares y helicoidales **mucho más resistentes que las WT al desensamblaje inducido por la hidrólisis de GTP** (Kenniston & Lemmon, 2010; Wang et al., 2010). Aunque todavía no es del todo claro el efecto que las mutaciones causantes de MCN tienen en la actividad enzimática de dinamina-2 en el contexto celular, nuestros resultados previos muestran que la inhibición farmacológica de la actividad GTP-asa de las dinaminas utilizando dynole 34-2 disminuye significativamente la potenciación a largo plazo en rebanadas hipocámpales de cerebros de ratón adulto (Arriagada-Díaz et al., 2020) (Figura 3), similar a lo que observamos en rebanadas del ratón HTZ (figuras 10,11). Esto último sugiere que la mutación p.R465W, impacta negativamente en la actividad GTP-asa de dinamina-2. Con respecto a esta posibilidad, Hinostroza y colaboradores, utilizando simulación de dinámica molecular, demostraron recientemente que la sustitución de una arginina (R) por un triptófano (W) en la posición 465 de dinamina-2 modifica las interacciones de este residuo con otros aminoácidos en modelos donde se utilizaron dímeros que contenían la mutación p.R465W. Estos cambios parecen transmitirse alostéricamente a través de la proteína, ya que la mutación p.R465W impacta en las interacciones dinamina-dinamina generando una desestabilización indirecta en la interacción entre monómeros vía la interfase-2 (figura 2B). Estos cambios, favorecen la conformación extendida del BSE en monómeros mutantes de dinamina-2, lo que repercute en la formación de estructuras de orden superior como oligómeros y anillos de dinamina-2 (Hinostroza

et al., 2020). Esto probablemente afecta su función catalítica, y consecuentemente impacta en los procesos donde se requiere el auto-ensamblaje de la dinamina-2, como la endocitosis y el remodelamiento de actina. Con respecto a esto último, se demostró recientemente por Lin y colaboradores que dinamina-2 regula la dinámica de actina en sinapsis periféricas, y de ese modo controla el desarrollo de la estructura post-sináptica en las uniones neuromusculares (NMJ) (S. S. Lin et al., 2020). Según los autores ésta función de dinamina-2 se ve afectada por mutantes que causan MCN (S. S. Lin et al., 2020) alterando la estructura post-sináptica. Probablemente algo similar ocurre con las estructuras sinápticas a nivel central, en las sinapsis excitatorias hipocámpales del ratón HTZ.

Los resultados de nuestro trabajo podrían aportar valiosa información para comprender mejor el papel de dinamina-2 en la transmisión sináptica excitatoria y en la neuroplasticidad y para entender el porqué de los defectos del aprendizaje que se manifiestan tempranamente en pacientes con MCN.

Proyecciones

Este trabajo pretende ser un aporte en el entendimiento del rol de dinamina-2 en sinapsis excitatorias, específicamente en su participación en los mecanismos que subyacen a distintos tipos de plasticidad sináptica los cuales repercuten en procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje. Este trabajo tiene como finalidad, convertirse en un aporte en la investigación y en la búsqueda de terapias que logren restaurar distintos tipos de defectos observados en individuos que sufren de MCN, ya que al comprender de qué manera la mutación p.R465W, la más común causante de MCN, impacta sobre las funciones que desempeña dinamina-2, podremos profundizar en los mecanismos que producen el fenotipo clínico.

Esperamos que nuestro trabajo, prontamente logre ser complementado con nuevos experimentos que nos permitan clarificar el rol de dinamina-2 en sinapsis hipocampales. En particular, nos parece importante conocer los posibles efectos de la mutación p.R465W en el tráfico de AMPAR y NMDAR en espinas dendríticas, ya que como comentamos anteriormente, el deterioro del funcionamiento de dinamina-2 debido a esta mutación, puede llegar a repercutir en la densidad de estos receptores en las membranas postsinápticas. Otro punto que nos parece importante dilucidar, son las posibles implicaciones que puede generar la mutación p.R465W en dinamina-2, en la liberación de vesículas sinápticas y en la maquinaria de recaptura de SVs a nivel presináptico. Si bien es cierto que dinamina-2 presenta una mayor expresión a nivel postsináptico, nuestros experimentos no son lo suficientemente concluyentes para descartar algún tipo de deterioro en la liberación de neurotransmisores desde sinapsis aferentes. Creemos que la utilización de nuevos protocolos electrofisiológicos como la utilización de patch-clam, que nos permita analizar diferencias en eventos espontáneos mEPSP y mEPSC entre nuestros individuos

de experimentación, nos permitiría avanzar en esta tarea. Por último, nos parece interesante estudiar las posibles implicaciones que puede llegar a tener la mutación p.R465W en sinapsis inhibitorias, ya que como sabemos, estas sinapsis presentan una mayor probabilidad de liberación y frecuencia de disparo, que permiten el balance necesario para que no ocurra una sobreexcitación a nivel sináptico. Un mal funcionamiento de las dinaminas en este tipo de sinapsis, tanto a nivel presináptico como postsináptico, puede también afectar mecanismos de plasticidad sináptica los cuales pueden llegar a repercutir en las funciones cognitivas de pacientes que sufren de MCN.

Referencias

- Anggono, V., & Huganir, R. L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 22, Issue 3, pp. 461–469). Curr Opin Neurobiol. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.12.006>
- Antonny, B., Burd, C., De Camilli, P., Chen, E., Daumke, O., Faelber, K., Ford, M., Frolov, V. A., Frost, A., Hinshaw, J. E., Kirchhausen, T., Kozlov, M. M., Lenz, M., Low, H. H., McMahon, H., Merrifield, C., Pollard, T. D., Robinson, P. J., Roux, A., & Schmid, S. (2016). Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.15252/emboj.201694613>
- Ardiles, A. O., Flores-Muñoz, C., Toro-Ayala, G., Cárdenas, A. M., Palacios, A. G., Muñoz, P., Fuenzalida, M., Sáez, J. C., & Martínez, A. D. (2014). Pannexin 1 regulates bidirectional hippocampal synaptic plasticity in adult mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(OCT). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00326>
- Arriagada-Díaz, J., Prado-Vega, L., Cárdenas Díaz, A. M., Ardiles, A. O., & Gonzalez-Jamett, A. M. (2020). Dynamin Superfamily at Pre- and Postsynapses: Master Regulators of Synaptic Transmission and Plasticity in Health and Disease. In *Neuroscientist*. SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1073858420974313>
- Ashby, M. C., De La Rue, S. A., Ralph, G. S., Uney, J., Collingridge, G. L., & Henley, J. M. (2004). Removal of AMPA receptors (AMPArs) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs. *Journal of Neuroscience*, 24(22), 5172–5176. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1042-04.2004>
- Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and

- behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*.
<https://doi.org/10.1037/h0077579>
- Bayazitov, I. T., Richardson, R. J., Fricke, R. G., & Zakharenko, S. S. (2007). Slow presynaptic and fast postsynaptic components of compound long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 27(43), 11510–11521. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3077-07.2007>
- Bitoun, M., Maugendre, S., Jeannet, P. Y., Lacène, E., Ferrer, X., Laforêt, P., Martin, J. J., Laporte, J., Lochmüller, H., Beggs, A. H., Fardeau, M., Eymard, B., Romero, N. B., & Guicheney, P. (2005). Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1657>
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews*, 94(1), 235–263. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>
- Bliss, T. V. P., & Cooke, S. F. (2011). Long-term potentiation and long-term depression: A clinical perspective. *Clinics*, 66(SUPPL.1), 3–17. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322011001300002>
- Böhm, J., Biancalana, V., DeChene, E. T., Bitoun, M., Pierson, C. R., Schaefer, E., Karasoy, H., Dempsey, M. A., Klein, F., Dondaine, N., Kretz, C., Haumesser, N., Poirson, C., Toussaint, A., Greenleaf, R. S., Barger, M. A., Mahoney, L. J., Kang, P. B., Zanuteli, E., ... Laporte, J. (2012). Mutation spectrum in the large gtpase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.22067>
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., & Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*, 82(2), 444–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>

- Bosch, M., & Hayashi, Y. (2012). Structural plasticity of dendritic spines. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 22, Issue 3, pp. 383–388). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.002>
- Byers, C. E., Barylko, B., Ross, J. A., Southworth, D. R., James, N. G., Taylor, C. A., Wang, L., Collins, K. A., Estrada, A., Waung, M., Tassin, T. C., Huber, K. M., Jameson, D. M., & Albanesi, J. P. (2015). Enhancement of dynamin polymerization and GTPase activity by Arc/Arg3.1. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(6), 1310–1318. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.002>
- Cárdenas, A. M., & Marengo, F. D. (2010). Rapid endocytosis and vesicle recycling in neuroendocrine cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9579-8>
- Carroll, R. C., Beattie, E. C., Xia, H., Lüscher, C., Altschuler, Y., Nicoll, R. A., Malenka, R. C., & Von Zastrow, M. (1999). Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.14112>
- Chappie, J. S., Acharya, S., Liu, Y. W., Leonard, M., Pucadyil, T. J., & Schmid, S. L. (2009). An intramolecular signaling element that modulates dynamin function in vitro and in vivo. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-04-0318>
- Chappie, J. S., Mears, J. A., Fang, S., Leonard, M., Schmid, S. L., Milligan, R. A., Hinshaw, J. E., & Dyda, F. (2011). A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.003>
- Chen, M. S., Obar, R. A., Schroeder, C. C., Austin, T. W., Poodry, C. A., Wadsworth, S. C., & Vallee, R. B. (1991). Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/351583a0>

- Chowdhury, S., Shepherd, J. D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R. S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R. L., & Worley, P. F. (2006). Arc/Arg3.1 Interacts with the Endocytic Machinery to Regulate AMPA Receptor Trafficking. *Neuron*, 52(3), 445–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.033>
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 33, Issue 1, pp. 18–41). Neuropsychopharmacology. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E., & Schmid, S. L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.4.915>
- Durieux, A. C., Prudhon, B., Guicheney, P., & Bitoun, M. (2010). Dynamin 2 and human diseases. In *Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0587-4>
- Durieux, A. C., Vignaud, A., Prudhon, B., Viou, M. T., Beuvin, M., Vassilopoulos, S., Fraysse, B., Ferry, A., Lainé, J., Romero, N. B., Guicheney, P., & Bitoun, M. (2010). A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq413>
- Echaniz-Laguna, A., Nicot, A. S., Carré, S., Franques, J., Tranchant, C., Dondaine, N., Biancalana, V., Mandel, J. L., & Laporte, J. (2007). Subtle central and peripheral nervous system abnormalities in a family with centronuclear myopathy and a novel dynamin 2 gene mutation. *Neuromuscular Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.06.467>
- Ehlers, M. D. (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron*, 28(2), 511–525. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00129-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00129-X)
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory

- in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47–59.
[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X)
- Faelber, K., Posor, Y., Gao, S., Held, M., Roske, Y., Schulze, D., Haucke, V., Noé, F., & Daumke, O. (2011). Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature10369>
- Ferguson, S. M., & De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3266>
- Ferguson, S., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., Ferguson, A., Destaing, O., Ko, G., Takasaki, J., Cremona, O., O' Toole, E., & De Camilli, P. (2009). Coordinated Actions of Actin and BAR Proteins Upstream of Dynamin at Endocytic Clathrin-Coated Pits. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.11.005>
- Fischer, D., Herasse, M., Bitoun, M., Barragán-Campos, H. M., Chiras, J., Laforêt, P., Fardeau, M., Eymard, B., Guicheney, P., & Romero, N. B. (2006). Characterization of the muscle involvement in dynamin 2-related centronuclear myopathy. *Brain*.
<https://doi.org/10.1093/brain/awl071>
- Flores-Muñoz, C., Gómez, B., Mery, E., Mujica, P., Gajardo, I., Córdova, C., Lopez-Espíndola, D., Durán-Aniotz, C., Hetz, C., Muñoz, P., Gonzalez-Jamett, A. M., & Ardiles, Á. O. (2020). Acute Pannexin 1 Blockade Mitigates Early Synaptic Plasticity Defects in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00046>
- Ford, M. G. J., Jenni, S., & Nunnari, J. (2011). The crystal structure of dynamin. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature10441>
- Fortin, D. A., Srivastava, T., & Soderling, T. R. (2012). Structural modulation of dendritic spines during synaptic plasticity. In *Neuroscientist* (Vol. 18, Issue 4, pp. 326–341). Neuroscientist.

<https://doi.org/10.1177/1073858411407206>

- Fujii, S., Tanaka, H., & Hirano, T. (2017). Detection and characterization of individual endocytosis of AMPA-type glutamate receptor around postsynaptic membrane. *Genes to Cells*, 22(6), 583–590. <https://doi.org/10.1111/gtc.12493>
- Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K., & Inokuchi, K. (2003). Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron*, 38(3), 447–460. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00206-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00206-X)
- Gajardo, I., Salazar, C. S., Lopez-Espíndola, D., Estay, C., Flores-Muñoz, C., Elgueta, C., Gonzalez-Jamett, A. M., Martínez, A. D., Muñoz, P., & Ardiles, Á. O. (2018). Lack of pannexin 1 alters synaptic GluN2 subunit composition and spatial reversal learning in mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00114>
- Gawel, K., Gibula, E., Marszalek-Grabska, M., Filarowska, J., & Kotlinska, J. H. (2019). Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. In *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1589-y>
- Gerges, N. Z., Backos, D. S., Rupasinghe, C. N., Spaller, M. R., & Esteban, J. A. (2006). Dual role of the exocyst in AMPA receptor targeting and insertion into the postsynaptic membrane. *EMBO Journal*, 25(8), 1623–1634. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601065>
- Glebov, O. O., Tigaret, C. M., Mellor, J. R., & Henley, J. M. (2015). Clathrin-independent trafficking of AMPA receptors. *Journal of Neuroscience*, 35(12), 4830–4836. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3571-14.2015>
- González-Jamett, A. M., Báez-Matus, X., Hevia, M. A., Guerra, M. J., Olivares, M. J., Martínez, A. D., Neely, A., & Cárdenas, A. M. (2010). The association of dynamin with

- synaptophysin regulates quantal size and duration of exocytotic events in chromaffin cells. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5210-09.2010>
- González-Jamett, A. M., Baez-Matus, X., Olivares, M. J., Hinostroza, F., Guerra-Fernández, M. J., Vasquez-Navarrete, J., Bui, M. T., Guicheney, P., Romero, N. B., Bevilacqua, J. A., Bitoun, M., Caviedes, P., & Cárdenas, A. M. (2017). Dynamin-2 mutations linked to Centronuclear Myopathy impair actin-dependent trafficking in muscle cells. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04418-w>
- González-Jamett, A. M., Guerra, M. J., Olivares, M. J., Haro-Acuña, V., Baéz-Matus, X., Vásquez-Navarrete, J., Momboisse, F., Martinez-Quiles, N., & Cárdenas, A. M. (2017). The F-actin binding protein cortactin regulates the dynamics of the exocytotic fusion pore through its SH3 domain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00130>
- González-Jamett, A. M., Haro-Acuña, V., Momboisse, F., Caviedes, P., Bevilacqua, J. A., & Cárdenas, A. M. (2014a). Dynamin-2 in nervous system disorders. In *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.12455>
- González-Jamett, A. M., Haro-Acuña, V., Momboisse, F., Caviedes, P., Bevilacqua, J. A., & Cárdenas, A. M. (2014b). Dynamin-2 in nervous system disorders. In *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.12455>
- González-Jamett, A. M., Momboisse, F., Guerra, M. J., Ory, S., Báez-Matus, X., Barraza, N., Calco, V., Houy, S., Couve, E., Neely, A., Martínez, A. D., Gasman, S., & Cárdenas, A. M. (2013). Dynamin-2 Regulates Fusion Pore Expansion and Quantal Release through a Mechanism that Involves Actin Dynamics in Neuroendocrine Chromaffin Cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070638>
- González-Jamett, A. M., Momboisse, F., Haro-Acuña, V., Bevilacqua, J. A., Caviedes, P., &

- Cárdenas, A. M. (2013). Dynamin-2 function and dysfunction along the secretory pathway. In *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00126>
- Groc, L., Heine, M., Cognet, L., Brickley, K., Stephenson, F. A., Lounis, B., & Choquet, D. (2004). Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nature Neuroscience*, 7(7), 695–696. <https://doi.org/10.1038/nn1270>
- Gu, C., Yaddanapudi, S., Weins, A., Osborn, T., Reiser, J., Pollak, M., Hartwig, J., & Sever, S. (2010). Direct dynaming-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.249>
- Hamao, K., Morita, M., & Hosoya, H. (2009). New function of the proline rich domain in dynamin-2 to negatively regulate its interaction with microtubules in mammalian cells. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.01.025>
- Hanley, J. G. (2014). Actin-dependent mechanisms in AMPA receptor trafficking. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 8, Issue November). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00381>
- Henley, J. M., Barker, E. A., & Glebov, O. O. (2011). Routes, destinations and delays: Recent advances in AMPA receptor trafficking. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 34, Issue 5, pp. 258–268). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.004>
- Henley, J. R., Krueger, E. W. A., Oswald, B. J., & McNiven, M. A. (1998). Dynamin-mediated internalization of caveolae. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.1.85>
- Hinostroza, F., Neely, A., Araya-Duran, I., Marabolí, V., Canan, J., Rojas, M., Aguayo, D., Latorre, R., González-Nilo, F. D., & Cárdenas, A. M. (2020). Dynamin-2 R465W mutation induces long range perturbation in highly ordered oligomeric structures. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75216-0>
- Hinshaw, J. E., & Schmid, S. L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a

- mechanism for coated vesicle budding. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/374190a0>
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2008). The Subspine Organization of Actin Fibers Regulates the Structure and Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron*, 57(5), 719–729. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.013>
- Ishida, N., Nakamura, Y., Tanabe, K., Li, S. A., & Takei, K. (2011). Dynamin 2 associates with microtubules at mitosis and regulates cell cycle progression. *Cell Structure and Function*. <https://doi.org/10.1247/csf.10016>
- Jaskolski, F., Mayo-Martin, B., Jane, D., & Henley, J. M. (2009). Dynamin-dependent membrane drift recruits AMPA receptors to dendritic spines. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808401200>
- Jeannet, P. Y., Bassez, G., Eymard, B., Laforêt, P., Urtizberea, J. A., Rouche, A., Guicheney, P., Fardeau, M., & Romero, N. B. (2004). Clinical and histologic findings in autosomal centronuclear myopathy. In *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000124388.67003.56>
- Jones, S. M., Howell, K. E., Henley, J. R., Cao, H., & McNiven, M. A. (1998). Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans- Golgi network. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.573>
- Kenniston, J. A., & Lemmon, M. A. (2010). Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.187>
- Kim, C. H., & Lisman, J. E. (1999). A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 19(11), 4314–4324. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-11-04314.1999>
- Klocke, R., Augustin, A., Ronsiek, M., Stief, A., Van Der Putten, H., & Jockusch, H. (1997).

- Dynamin genes Dnm1 and Dnm2 are located on proximal mouse chromosomes 2 and 9, respectively. *Genomics*. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4634>
- Koenig, J. H., & Ikeda, K. (1989). Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.09-11-03844.1989>
- Koleske, A. J. (2013). Molecular mechanisms of dendrite stability. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 14, Issue 8, pp. 536–550). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3486>
- Kong, L., Sochacki, K. A., Wang, H., Fang, S., Canagarajah, B., Kehr, A. D., Rice, W. J., Strub, M. P., Taraska, J. W., & Hinshaw, J. E. (2018). Cryo-EM of the dynamin polymer assembled on lipid membrane. *Nature*, 560(7717), 258–262. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0378-6>
- Kopec, C. D., Li, B., Wei, W., Boehm, J., & Malinow, R. (2006). Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 26(7), 2000–2009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3918-05.2006>
- Koutsopoulos, O. S., Koch, C., Tosch, V., Böhm, J., North, K. N., & Laporte, J. (2011). Mild Functional Differences of Dynamin 2 Mutations Associated to Centronuclear Myopathy and Charcot-Marie-Tooth Peripheral Neuropathy. *PLoS ONE*, 6(11), e27498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027498>
- Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R., & Rodriguez-Boulan, E. (2000). Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/35000081>
- Kroll, J. R., Wong, K. G., Siddiqui, F. M., & Tanouye, M. A. (2015). Disruption of endocytosis with the dynamin mutant shibirets1 suppresses seizures in drosophila. *Genetics*.

<https://doi.org/10.1534/genetics.115.177600>

- Lanzetti, L. (2007). Actin in membrane trafficking. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 19, Issue 4, pp. 453–458). Curr Opin Cell Biol. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.04.017>
- Lee, H. K. (2006). Synaptic plasticity and phosphorylation. In *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.06.003>
- Lin, B., Kramár, E. A., Bi, X., Brucher, F. A., Gall, C. M., & Lynch, G. (2005). Theta stimulation polymerizes actin in dendritic spines of hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 25(8), 2062–2069. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4283-04.2005>
- Lin, S. S., Hsieh, T. L., Liou, G. G., Li, T. N., Lin, H. C., Chang, C. W., Wu, H. Y., Yao, C. K., & Liu, Y. W. (2020). Dynamin-2 Regulates Postsynaptic Cytoskeleton Organization and Neuromuscular Junction Development. *Cell Reports*, 33(4). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108310>
- Loerke, D., Mettlen, M., Yarar, D., Jaqaman, K., Jaqaman, H., Danuser, G., & Schmid, S. L. (2009). Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000057>
- Lu, J., Helton, T. D., Blanpied, T. A., Rácz, B., Newpher, T. M., Weinberg, R. J., & Ehlers, M. D. (2007). Postsynaptic Positioning of Endocytic Zones and AMPA Receptor Cycling by Physical Coupling of Dynamin-3 to Homer. *Neuron*, 55(6), 874–889. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.041>
- Lu, W. Y., Man, H. Y., Ju, W., Trimble, W. S., MacDonald, J. F., & Wang, Y. T. (2001). Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 29(1), 243–254. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00194-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00194-5)
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and

- long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), 1–15.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., & Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin. *Developmental Cell*, 10(6), 839–850.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.002>
- Maeda, K., Nakata, T., Noda, Y., Sato-Yoshitake, R., & Hirokawa, N. (1992). Interaction of dynamin with microtubules: Its structure and GTPase activity investigated by using highly purified dynamin. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.3.10.1181>
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. In *Neuron* (Vol. 44, Issue 1, pp. 5–21). Neuron. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>
- Man, H. Y., Lin, J. W., Ju, W. H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L. E., Sheng, M., & Wang, Y. T. (2000). Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron*, 25(3), 649–662. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81067-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81067-3)
- Mooren, O. L., Kotova, T. I., Moore, A. J., & Schafer, D. A. (2009). Dynamin2 GTPase and cortactin remodel actin filaments. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024398>
- Musleh, W., Bi, X., Tocco, G., Yaghoubi, S., & Baudry, M. (1997). *Glycine-induced long-term potentiation is associated with structural and functional modifications of-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors* (Vol. 94). www.pnas.org.
- Negrón-Oyarzo, I., Neira, D., Espinosa, N., Fuentealba, P., & Aboitiz, F. (2015). Prenatal stress produces persistence of remote memory and disrupts functional connectivity in the hippocampal-prefrontal cortex axis. *Cerebral Cortex*. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu108>
- Nicoziani, P., Vilhardt, F., Llorente, A., Hilout, L., Courtoy, P. J., Sandvig, K., & Van Deurs, B.

- (2000). Role for dynamin in late endosome dynamics and trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.2.481>
- Noakes, P. G., Chin, D., Kim, S. S., Liang, S., & Phillips, W. D. (1999). Expression and localisation of dynamin and syntaxin during neural development and neuromuscular synapse formation. *Journal of Comparative Neurology*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990809\)410:4<531::AID-CNE2>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990809)410:4<531::AID-CNE2>3.0.CO;2-C)
- Okamoto, K., Bosch, M., & Hayashi, Y. (2009). The roles of CaMKII and F-Actin in the structural plasticity of dendritic Spines: A potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology*, 24(6), 357–366. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2009>
- Okamoto, P. M., Gamby, C., Wells, D., Fallon, J., & Vallee, R. B. (2001). Dynamin Isoform-specific Interaction with the Shank/ProSAP Scaffolding Proteins of the Postsynaptic Density and Actin Cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104927200>
- Park, M. (2018). AMPA receptor trafficking for postsynaptic potentiation. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00361>
- Park, M., Penick, E. C., Edwards, J. G., Kauer, J. A., & Ehlers, M. D. (2004). Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science*, 305(5692), 1972–1975. <https://doi.org/10.1126/science.1102026>
- Park, M., Salgado, J. M., Ostroff, L., Helton, T. D., Robinson, C. G., Harris, K. M., & Ehlers, M. D. (2006). Plasticity-Induced Growth of Dendritic Spines by Exocytic Trafficking from Recycling Endosomes. *Neuron*, 52(5), 817–830. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.040>

- Penzes, P., & Rafalovich, I. (2012). Regulation of the actin cytoskeleton in dendritic spines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 970, 81–95. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_4
- Pitts, M. (2018). Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. *BIO-PROTOCOL*. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2744>
- Poodry, C. A., & Edgar, L. (1979). Reversible alterations in the neuromuscular junctions of *Drosophila melanogaster* bearing a temperature-sensitive mutation, shibire. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.81.3.520>
- Praefcke, G. J. K., & McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily: Universal membrane tubulation and fission molecules? In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm1313>
- Raimondi, A., Ferguson, S. M., Lou, X., Armbruster, M., Paradise, S., Giovedi, S., Messa, M., Kono, N., Takasaki, J., Cappello, V., O'Toole, E., Ryan, T. A., & De Camilli, P. (2011). Overlapping Role of Dynamin Isoforms in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.031>
- Rappoport, J. Z., & Simon, S. M. (2003). Real-time analysis of clathrin-mediated endocytosis during cell migration. In *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.00289>
- Singh, M., Jadhav, H. R., & Bhatt, T. (2017). Dynamin functions and ligands: Classical mechanisms behind. In *Molecular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1124/mol.116.105064>
- Star, E. N., Kwiatkowski, D. J., & Murthy, V. N. (2002). Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nature Neuroscience*, 5(3), 239–246. <https://doi.org/10.1038/nm811>
- Sukoff Rizzo, S. J., & Crawley, J. N. (2017). Behavioral Phenotyping Assays for Genetic Mouse Models of Neurodevelopmental, Neurodegenerative, and Psychiatric Disorders. *Annual*

- Review of Animal Biosciences*. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022754>
- Tanifuji, S., Funakoshi-Tago, M., Uedas, F., Kasaharas, T., & Mochida, S. (2013). Dynamin isoforms decode action potential firing for synaptic vesicle recycling. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445874>
- Van Dam, E. M., & Stoorvogel, W. (2002). Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, 13(1), 169–182. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-07-0380>
- Wang, L., Barylko, B., Byers, C., Ross, J. A., Jameson, D. M., & Albanesi, J. P. (2010). Dynamin 2 mutants linked to centronuclear myopathies form abnormally stable polymers. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.C110.130013>
- Warnock, D. E., & Schmid, S. L. (1996). Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. In *BioEssays*. <https://doi.org/10.1002/bies.950181107>
- Wenger, J., Klinglmayr, E., Fröhlich, C., Eibl, C., Gimeno, A., Hessenberger, M., Puehringer, S., Daumke, O., & Goettig, P. (2013). Functional mapping of human dynamin-1-like GTPase domain based on x-ray structure analyses. *PloS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071835>
- Yamada, H., Abe, T., Satoh, A., Okazaki, N., Tago, S., Kobayashi, K., Yoshida, Y., Oda, Y., Watanabe, M., Tomizawa, K., Matsui, H., & Takei, K. (2013). Stabilization of actin bundles by a Dynamin 1/cortactin ring complex is necessary for growth cone filopodia. *Journal of Neuroscience*, 33(10), 4514–4526. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2762-12.2013>
- Yan, J., Liu, X. H., Han, M. Z., Wang, Y. M., Sun, X. L., Yu, N., Li, T., Su, B., & Chen, Z. Y. (2015). Blockage of GSK3 β -mediated Drp1 phosphorylation provides neuroprotection in neuronal and mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.08.005>

- Yang, S. N., Tang, Y. G., & Zucker, R. S. (1999). Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ elevation. *Journal of Neurophysiology*.
<https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.2.781>
- Yudowski, G. A., Puthenveedu, M. A., Leonoudakis, D., Panicker, S., Thorn, K. S., Beattie, E. C., & Von Zastrow, M. (2007). Real-time imaging of discrete exocytic events mediating surface delivery of AMPA receptors. *Journal of Neuroscience*, 27(41), 11112–11121.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2465-07.2007>
- Zhang, R., Lee, D. M., Jimah, J. R., Gerassimov, N., Yang, C., Kim, S., Luvsanjav, D., Winkelman, J., Mettlen, M., Abrams, M. E., Kalia, R., Keene, P., Pandey, P., Ravaux, B., Kim, J. H., Ditlev, J. A., Zhang, G., Rosen, M. K., Frost, A., ... Chen, E. H. (2020). Dynamin regulates the dynamics and mechanical strength of the actin cytoskeleton as a multifilament actin-bundling protein. *Nature Cell Biology*, 22(6), 674–688.
<https://doi.org/10.1038/s41556-020-0519-7>
- Zhang, X. Y., Ji, F., Wang, N., Chen, L. L., Tian, T., & Lu, W. (2014). Glycine induces bidirectional modifications in N-Methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic responses in hippocampal CA1 neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 31200–31211.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.570630>
- Zheng, N., Jeyifous, O., Munro, C., Montgomery, J. M., & Green, W. N. (2015). Synaptic activity regulates AMPA receptor trafficking through different recycling pathways. *ELife*, 4(MAY). <https://doi.org/10.7554/eLife.06878>
- Zhou, Q., Homma, K. J., & Poo, M. M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44(5), 749–757.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.011>
- Züchner, S., Nouredine, M., Kennerson, M., Verhoeven, K., Claeys, K., De Jonghe, P., Merory,

J., Oliveira, S. A., Speer, M. C., Stenger, J. E., Walizada, G., Zhu, D., Pericak-Vance, M. A., Nicholson, G., Timmerman, V., & Vance, J. M. (2005). Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1514>