



**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE**

DNA METABOLISM ROLE'S IN NEURONAL ACTIVITY-DEPENDENT PROCESSES

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Sara Bachiller Sánchez Arévalo
bajo la dirección del
Doctor Ángel M. Carrión Rodríguez y la Doctora Rocío Ruiz Laza**

Sevilla, 2017



**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE**

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide. Presentada por **SARA BACHILLER SÁNCHEZ ARÉVALO**. Realizada en la Universidad Pablo de Olavide, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, División de Neurociencias; bajo la dirección del Dr. Ángel M. Carrión Rodríguez y la Dra. Rocío Ruiz Laza.

**Vº. Bº del director de la Tesis
Dr. Ángel M. Carrión Rodríguez**

**Vº. Bº de la codirectora de la Tesis
Rocío Ruiz Laza**

**La doctoranda,
Sara Bachiller Sánchez Arévalo**



**Dr. Ángel M. Carrión Rodríguez,
Facultad de Ciencias Experimentales,
Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular.
Universidad Pablo de Olavide.**

**Dra. Rocío Ruiz Laza,
Facultad de Farmacia,
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Universidad de Sevilla.**

HACEN CONSTAR: Que Doña SARA BACHILLER SÁNCHEZ ARÉVALO, ha realizado bajo sus direcciones y en el Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, de la Universidad Pablo de Olavide, el trabajo de su Tesis Doctoral: "DNA metabolism role's in neuronal activity-dependent processes", y que consideran que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de doctor.

Revisada la memoria del trabajo, quedan conformes con su presentación.

En Sevilla, a 10 de Mayo de 2017

Dr. Ángel M. Carrión Rodríguez

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ángel M. Carrión Rodríguez".

Dra. Rocío Ruiz Laza

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Rocío Ruiz Laza".

A mi familia.

***Una vida sin memoria no sería vida.
Nuestra memoria es nuestra coherencia, nuestra razón,
nuestra acción, nuestro sentimiento. Sin ella, no somos nada.
Luis Buñuel (1900-1983).***

AGRADECIMIENTOS

Dicen que cuatro años es mucho tiempo. ¡Qué mentira más absoluta! Que caprichoso es el tiempo, que pasa más rápido de lo que nunca esperaríamos.

Después de sentarme y pensarlo (frase que me marcó la primera vez que me la dijiste) he decidido empezar por ti, Ángel. Gracias por confiar en mí desde el principio y darme la oportunidad de formar parte de tu equipo. Te agradezco enormemente el que me hayas dejado ser yo misma, la libertad que siempre me has dado para la planificación de los experimentos y tu infinita disponibilidad y paciencia para discutirlos, pues todo ello ha hecho que tenga una actitud bastante crítica en el trabajo. Pero sobre todo, por los buenos momentos que hemos compartido, te agradezco que me hayas permitido crecer a tu lado como persona y como científica.

Las siguientes líneas son para ti, Rocío. A Rocío la codirectora, le diré que gracias por tu motivación constante, por confiar en mi criterio y por tu disponibilidad para discutir todos los obstáculos que se nos iban presentando. Me ha encantado compartir y aprender contigo en esta nueva etapa “codire-predoc”. A Rocío la amiga, gracias por haberme acogido desde el primer día haciendo que sintiera que tenía una familia en este rincón del sur, aún estando “tan lejos” de la mía. Estoy segura de que la vida te devolverá con creces todo lo que haces por los que tienes a tu alrededor.

Una mención especial tienen mis compañeros de laboratorio, con los que he pasado alegrías y emociones, aunque también algunas penas y frustraciones. A Irene, gracias por todo lo que me has aportado. Hemos reído, llorado, discutido, viajado por media Europa e incluso hemos cruzado el charco, pero sobretodo, nos hemos ayudado y hemos aprendido juntas en este mundo. A Paco, pues contigo empecé por esos pasillos del 21, gracias por enseñarme el maravilloso mundo de la PCR, por ser nuestro hombretón abriendo frascos y por todas las risas y momentos que hemos compartido durante este tiempo. A Marta, gracias por tu ayuda y por dejarme enseñarte. Eres un auténtico terremoto y créeme que llegarás donde quieras, porque los extremeños somos así, ¡grandes conquistadores! Quisiera agradecer también a todas las demás personas que han ido pasando por las poyatas del laboratorio (alumnos, técnicos, estancias, colaboraciones...) con las que he compartido pipetas y que han contribuido a que este día llegara. Por supuesto, no me puedo olvidar del resto de compañeros del edificio 21. Gracias al resto de profesores, becarios, técnicos, alumnos y personal del área de Fisiología. A las nuevas “pollitos” Ana, Mar y Flor; a Pier, José y José Antonio por vuestra ayuda técnica; a mi Clau y a Carlos; a los “Rodríguez”, sobre todo a mis latinos favoritos Yuniesky y Luis; a Eva y José Ángel, por preocuparos tanto por mí especialmente en esta última etapa tan caótica de escritura; y a los que ya no están por estos muros: Leo, Paloma, Marian, Samuel, Laurita, Germán... A todos, un millón de gracias por estos años.

No me gustaría dejar pasar el agradecer a la Dra. Carmen Sandi por el tiempo que pasé en su laboratorio. Muchas gracias, Carmen. También a todos los miembros de su equipo con

los que viví esa gran experiencia, en especial a Alex y Thomas, porque ha sido un auténtico placer aprender y trabajar con vosotros.

Las siguientes líneas se las quiero dedicar a los verdaderos “sufridores” de estos cuatro años que ha durado mi periodo predoctoral, mis amigos y mi familia.

Gracias a todos mis amigos de la gran ciudad minera, pues habéis sido un gran apoyo no solo en el periodo que ha durado la tesis, sino desde que tengo “conciencia”. Un poquito más especial a Blanca, Ana, Erika, Igna y Dani porque 15 años con vosotros no es suficiente y ya sabéis, que los viejos rockeros nunca mueren. A mis bio-amigos (Elena, Lucía, Fronti, Miguel, Ali, Pocho, Ismael, Fran, Antonio...) con los que aprendí lo que era el auténtico embrujo cordobés. A Blanca, porque seguiremos añadiendo páginas al maravilloso mundo de la rubia y la morena. A la maravillosa gente que me ha dado Sevilla, en especial a Luismi por brindarme su cariño, su amistad y sus fabulosos consejos. A Maca, por dar los primeros “neuropasos” conmigo y compartir un millón de momentos. A Natalí, Yolanda y Chana por vuestro apoyo y las “Spanish nights”. A Rocío (o Carmen, dependiendo del momento) por hacerme ver que Suiza siempre será algo más que un país y que la culpa jamás será del queso... pero lo más importante, por tu apoyo y amistad incondicional.

A Jony, gracias por todos los años que me has regalado a tu lado, por hacerme ver que la vida con un ron y miel sabe mejor y que la luna sale todas las noches solamente, porque sabe que el sol la está esperando.

A mis padres, gracias por haberme inculcado desde pequeña que la constancia y el esfuerzo siempre tienen su recompensa. Sois mi mayor ejemplo a seguir y nunca tendré suficientes palabras para agradeceros todo vuestro sacrificio y el amor que me dais día a día. A mi hermana, por ser el espejo en el que mirarse y una persona maravillosa. Gracias por escucharme, por ayudarme, por animarme, por motivarme y sobre todo por hacerme tan feliz. A mi cuñado, gracias también por tus consejos, por tus palabras de apoyo y por la confianza que siempre me has demostrado. Y por último, a Ángela, la personita que ha trastocado nuestras vidas y que aún sin hablar, es la mayor de mis motivaciones.

Para finalizar, y como manchega que soy, no se me ocurre mejor manera de hacerlo que con esta pequeña reflexión:

“Como no estás experimentado en las cosas del mundo, todas las cosas que tienen algo de dificultad te parecen imposibles... Confía en el tiempo, que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades”.

El ingenioso hidalgo Don Quijote de la Mancha.
Miguel de Cervantes.

ABSTRACT

Recently some studies demonstrate that adult neuronal genome is a genetic mosaic but the role of this mosaicism and how is generated are not well known. The two main mechanisms that could result in the neuronal mosaic genome are somatic recombination and the LINE-1 (L1) retrotransposition. Some evidences of alterations in central nervous system development found in knock-out (KO) mice for proteins related with DNA repair processes and L1 activation in neuronal precursors, suggest that neuronal genome mosaicism may be related with the generation of neuronal diversity during central nervous system development. However, if the genome reorganization processes take place in the adult nervous system during neuronal plasticity events are not yet established. Recently, it has been reported that neuronal activity transiently provokes increase of neuronal DNA breaks in cerebral areas where long-term neuronal plasticity events takes place, in some case related with cognition. DNA breaks have been related with the initial steps of gene expression activation, but also can be compatible with genomic reorganization.

The main objective of this PhD project was to determinate the potential role of processes that may result in genomic reorganization during neuronal activation. Firstly, we studied the importance of adult L1 retrotransposition in neuronal activation processes. Our results showed an activity-dependent increase in genome *de novo* L1 insertions in the hippocampus. Using systemic pharmacologic and intrahippocampal genetic approaches, we also demonstrate that L1 activation in the adult hippocampus is required for long-term memory formation. Secondly, we looked for evidences of potential genome reorganization events induced by exploration of an enriched environment, a protocol that provokes neuronal activity-dependent events. Exploratory session provoked an increase in the number of neurons containing DNA breaks, measured as the number of cells with 53BP1 foci, and in gene expression of genes related with DNA metabolism and DNA breaks. Both events happen in a sequential temporal-dependent manner in hippocampus and prefrontal cortex. Thirdly, to clear up the possible physiological role of DNA metabolism proteins in cognition, we performed passive avoidance test in transient TDP1, TDP2 and H2AX knock down mice induced by local hippocampal administration of specific antisense oligonucleotides (ASOs). Passive avoidance is an hippocampal-dependent cognition test in which the long-term memory formation in our study was impaired by the hippocampal administration of each specific ASOs. Finally, using the H2AX^{-/-} mice we studied the role of H2AX in central nervous system function. H2AX^{-/-} mice showed morphological alterations in the amygdala and hippocampus compared with the wt mice. Also, at behavioral level H2AX^{-/-} mice presented deficits in depressive, cognition and social behaviors.

In conclusion, all these data together suggest activity-dependent neural DNA reorganizations in the adult hippocampus. In addition, genetic and pharmacological manipulations of DNA reorganizations events in adult brain seem to affect cognition processes such as memory formation. Finally, depletion of H2AX in the germinal line provokes alteration in central nervous system function.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
I. MECANISMOS DE REPARACIÓN Y REORGANIZACIONES GENÓMICAS.	3
1. MECANISMOS DE REPARACIÓN DE LAS ROTURAS DEL ADN.	4
1.1. <i>Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ).</i>	<i>6</i>
1.2. <i>Recombinación homóloga (RH).</i>	<i>10</i>
2. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS ROTURAS EN EL ADN.....	12
3. TRANSPOSICIÓN DE ELEMENTOS MÓVILES EN EL GENOMA	14
3.1. <i>Transposones de ADN.</i>	<i>15</i>
3.2. <i>Retrotransposones.</i>	<i>16</i>
II. PAPEL DE LAS REORGANIZACIONES GENÓMICAS Y DEL METABOLISMO DEL ADN EN EL SISTEMA NERVIOSO.	18
1. MOSAICO GENÉTICO EN EL CEREBRO.	18
2. RETROTRANSPOSICIÓN DE L1 EN EL CEREBRO.	20
3.- ROTURAS Y REPARACIONES DEL ADN NEURONAL.	22
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. SUJETOS EXPERIMENTALES.	31
2. FARMACOLOGÍA E INACTIVACIÓN SELECTIVA DEL HIPOCAMPO.....	31
2.1. <i>Administración sistémica de fármacos</i>	<i>31</i>
2.2. <i>Inhibición transitoria y selectiva de la expresión génica con oligonucleótidos antisentido.</i>	<i>32</i>
2.3. <i>Implantación de cánulas.</i>	<i>32</i>
2.4. <i>Administración de los oligonucleótidos antisentidos.</i>	<i>33</i>
3. PRUEBAS CONDUCTUALES.	33

3.1. Conducta Motora: actividad en campo abierto, fuerza muscular y coordinación y aprendizaje motor.	33
3.2. Comportamiento Sensitivo: nocicepción y respuesta a estímulos acústicos de diferente intensidad.	34
3.3. Evaluación de los estados de ansiedad.	36
3.4. Evaluación del grado de depresión.	36
3.5. Conducta social.	37
3.6. Aprendizaje y memoria: memoria de trabajo, cognición sin componente emocional y cognición con componente emocional.	38
4. SACRIFICIO Y EXTRACCIÓN DEL TEJIDO.	39
5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.	40
5.1. Exposición a un ambiente enriquecido como protocolo de activación neuronal para el estudio de la expresión génica.	40
5.2. Extracción de ARN.	40
5.3. Extracción de ADN.	41
5.4. Cuantificación del ARN y del ADN obtenido.	41
5.5. Retrotranscripción del ARN.	42
5.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativa.	42
5.7. Electroforesis de ADN.	44
5.8. Cuantificación del ADN obtenido.	44
5.9. Obtención de muestras y genotipado de los ratones silvestres y mutantes nulos para el gen <i>h2ax</i>	44
6. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.	46
6.1. Tinción de Nissl.	46
6.2. Inmunohistoquímica.	46
6.3. Inmunofluorescencia.	48
6.4. Captura y análisis de las imágenes.	49

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	50
4. RESULTADOS	51
I. ACTIVACIÓN NEURONAL Y REORGANIZACIONES GENÓMICAS:	53
1. RETROTRANSPOSICIÓN DE LINE-1.	53
1.1.- <i>La exploración de un nuevo entorno provoca cambios en la retrotransposición de L1 en el hipocampo de ratón.....</i>	53
1.2.- <i>La inhibición farmacológica de la neurotransmisión glutamatérgica bloquea la retrotransposición de L1 inducida por la exploración de un ambiente rico en el hipocampo del ratón.</i>	53
1.3.- <i>La administración de bloqueantes de la retrotranscripción inhiben la activación de L1 sin afectar a la expresión de los genes de respuesta temprana dependientes de actividad en el hipocampo de ratón.....</i>	55
1.4.- <i>La administración de oligonucleótidos antisentido contra ORF1 y ORF22 reduce la formación de memoria a largo plazo en el test de evitación pasiva.</i>	56
2. ACTIVACIÓN NEURONAL Y ROTURA-REPARACIÓN DEL ADN	57
2.1.- <i>La exposición a un ambiente enriquecido provoca cambios secuenciales en la activación de la proteína 53BP1 en el giro dentado y en la corteza prefrontal del ratón.</i>	58
2.2.- <i>La exposición a un nuevo entorno enriquecido provoca cambios secuenciales en la expresión de genes relacionados con el metabolismo del ADN en el hipocampo y en la corteza prefrontal de ratones.</i>	58
2.3.- <i>La inhibición local de proteínas involucradas en procesos de rotura y reparación del ADN en el hipocampo provoca alteraciones en la formación de memorias en la prueba de evitación pasiva. .59</i>	
II: CARACTERIZACIÓN DEL RATÓN CARENTE DE H2AX (H2AX^{-/-}).....	61
1.- DESCRIPCIÓN ANATÓMICA E HISTOLÓGICA.	61
1.1.- <i>Estudio anatómico del cerebro de ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}.</i>	61
1.2.- <i>Estudio morfológico específico de neuronas maduras del hipocampo y la amígdala en el cerebro de ratones silvestres y mutantes H2AX^{-/-}.....</i>	62
1.3.- <i>Estudio sináptico y balance excitación/inhibición en el hipocampo, en la corteza prefrontal y en la amígdala del cerebro de ratones silvestres y mutantes nulos para H2AX.</i>	63
2.- CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL.....	63

2.1.- Evaluación del comportamiento motor en los ratones H2AX ^{+/+} y H2AX ^{-/-}	64
2.2.- Evaluación de las capacidades sensitivas en los ratones H2AX ^{+/+} y H2AX ^{-/-}	64
2.3.- Evaluación de la ansiedad y depresión en el modelo H2AX ^{+/+} y H2AX ^{-/-}	66
2.4.- Evaluación de la conducta social en los ratones H2AX ^{+/+} y H2AX ^{-/-}	66
2.5.- Evaluación del aprendizaje y la memoria en ratones silvestres y mutantes para H2AX.....	68
5. DISCUSIÓN	71
1. RETROTRANSPOSICIÓN DE LINE-1 EN EL SISTEMA NERVIOSO: MÁS ALLÁ DEL MOSAICO NEURONAL.	74
2. METABOLISMO DEL ADN Y SU IMPLICACIÓN EN LOS PROCESOS COGNITIVOS.....	75
3. ESTUDIO DEL MUTANTE NULO PARA H2AX.	76
6. CONCLUSIONS	79
BIBLIOGRAFÍA	83
ANEXOS.....	111
ANEXOS (I): TABLAS	113
ANEXOS (II): PUBLICACIONES.....	135

1. INTRODUCCIÓN

I. MECANISMOS DE REPARACIÓN Y REORGANIZACIONES GENÓMICAS.

La estabilidad genética es una característica fundamental de los organismos para que el material genético se conserve y se transmita fielmente de una generación a otra o de una célula somática a otra. Esto se consigue por la acción conjunta de procesos fidedignos de replicación y de reparación del ADN. Sin embargo, la evolución de las especies e incluso el buen funcionamiento de ciertos órganos requieren de la variación genómica. Algunos de estos cambios pueden estar programados previamente provocando reorganizaciones que regulan la diferenciación y el desarrollo de ciertos tipos celulares, como es el caso de la reorganización que tiene lugar para la producción de inmunoglobulinas en el sistema inmune (revisado de Cooper y Hausman, 2014). En otros casos, las variaciones genómicas no están programadas genéticamente y aparecen como consecuencia de mutaciones heredadas de la línea germinal, o bien pueden aparecer espontáneamente. Un ejemplo de las variaciones no programadas son las inserciones diferenciales de los elementos transponibles. Estos elementos pueden moldear los genomas de las células que los hospedan ya que pueden generar inserciones, deleciones y recombinaciones (revisado en Kovalchuk y col., 2016). Además, la frecuencia de las reorganizaciones genómicas puede verse alterada por las modificaciones epigenéticas y/o de las histonas que ocurren en respuesta a estímulos ambientales, afectando a la estabilidad genética del individuo (Jin y col., 2011; Déjardin y col., 2012). Por tanto, es necesario que exista un equilibrio entre la conservación y la variación de la información genética para el desarrollo de los organismos individuales.

A diario en una célula ocurren miles de eventos que pueden dañar la molécula del ADN. Estos daños pueden aparecer debido a la acción de factores de carácter endógeno o exógeno. Entre los factores endógenos se encuentran: los errores introducidos por la polimerasa en la replicación del ADN, la producción de especies reactivas de oxígeno como consecuencia indirecta del metabolismo celular (Lindahl y col., 2000) y las modificaciones químicas de los nucleótidos (oxidación, desaminaciones espontáneas, etc). En cuanto a los factores exógenos destacan: las radiaciones ionizantes y la exposición a ciertas moléculas con carácter mutagénico, como las utilizadas con fines quimioterapéuticos (Helleday y col., 2008; Curtin y col., 2012).

Algunos tipos de lesiones ocurren con una alta frecuencia y deben ser reparadas de forma eficiente. Por ejemplo, los daños oxidativos de los nucleótidos del ADN, como consecuencia del metabolismo celular, surgen y son reparados con una frecuencia de 10^5 lesiones por célula y día (Hoeijmakers, 2009). En cambio las lesiones debidas a roturas de las dos cadenas complementarias del ADN (DSBs, del inglés, “Doble-Strand Breaks”) simultáneamente, son menos frecuentes. En células humanas se producen unas 50 DSBs en cada ciclo celular, lo que supone una frecuencia de aparición de una DSB por cada 10^8 pares de

bases (Vilenchik y Knudson, 2003). Las DSBs son las lesiones más graves, pues pueden generar reajustes genómicos que afecten directamente a la viabilidad celular (Chapman y col., 2012). Así, por cada DSB que se produce en la molécula de ADN, tienen lugar 10 roturas de cadena simple (Ma y col., 2012).

Para garantizar la integridad del ADN, las células han desarrollado diferentes mecanismos de respuesta al daño en el ADN altamente especializados que coordinan la detección, la señalización y la reparación de la molécula de ADN (Ciccia y col., 2010; Thompson, 2012). En función de la severidad del daño, las células responderán activando las vías específicas de reparación, de apoptosis o deteniendo el ciclo celular, entre otros procesos (revisado de Gómez y col., 2016).

En humanos, fallos en los mecanismos de respuesta al daño en el ADN han sido relacionados con ciertas patologías como la predisposición al desarrollo del cáncer, el envejecimiento prematuro, defectos en el sistema inmunológico y en el desarrollo (Jackson y col., 2009; McKinnon, 2009).

1. MECANISMOS DE REPARACIÓN DE LAS ROTURAS DEL ADN.

Como se ha descrito anteriormente, los genomas de mamíferos están en constante exposición a factores internos y/o externos que provocan lesiones en el ADN y que han de ser reparadas para poder mantener la viabilidad celular.

Los daños en el ADN pueden presentarse de diferentes formas: lesiones en las bases, entrecruzamientos en una misma cadena o con su complementaria y rupturas en una o en las dos cadenas que conforman la molécula de ADN (Lindahl y col., 1993). Según la naturaleza de la lesión, la célula desencadena diferentes tipos de mecanismos de reparación (**Fig. 1**)

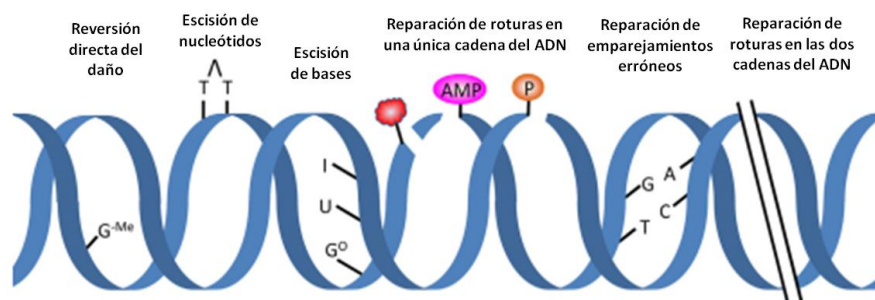


Figura 1. Daño en el ADN y respuestas de reparación específicas de la lesión. G-Me, O⁶ metilguanina; T^T; dímero de timina; I, iosina; U, uracilo; G^o, 8-oxoguanina. Modificado de Iyama y Wilson III, 2013.

1. INTRODUCCIÓN

En nuestro estudio, nos hemos centrado en las vías de reparación de las DSBs. No obstante, en la tabla anexo 1 se muestra un resumen de las principales vías de reparación del ADN así como las lesiones sobre las que actúan y los principales componentes de cada una de ellas.

Las DSBs pueden producirse por diversos factores (**Fig. 2**):

- **Exógenos:** las drogas quimioterapéuticas, los inhibidores de las topoisomerasas y la radiación ionizante.
 - ✓ Las drogas quimioterapéuticas: agentes alquilantes del ADN (temozolamida), provocando entrecruzamientos (mitomicina C y cisplatino) y los radiomiméticos (bleomicina) (Chen y Stubbe, 2005; Wyrobek y col., 2005).
 - ✓ Los inhibidores de las topoisomerasas: etopósido (Koster y col., 2007).
 - ✓ La radiación ionizante: produce radicales libres que atacan los enlaces azúcar-fosfato de las cadenas de ADN (Ward y col., 1994; Thompson, 2012).

- **Endógenos:** pausa o bloqueo de la horquilla de replicación (Pfeiffer y col., 2000) o programados para un fin celular específico (Chapman y col., 2012).
 - ✓ Errores previos en la estructura de la cromatina o del ADN (Prado y Aguilera, 2005).
 - ✓ Las colisiones directas con la maquinaria de transcripción (Aguilera y Gaillard, 2014).
 - ✓ La unión directa del ADN a proteínas (Mirkin y Mirkin, 2007).
 - ✓ Estrés físico o mecánico en la molécula de ADN (Lieber, 2010).
 - ✓ Generación de inmunoglobulinas (Dudley, 2005).
 - ✓ Generación de gametos (Keeney y Neale, 2006).

Los factores endógenos programados requieren de la generación de sitios específicos donde tenga lugar el corte de las dos cadenas del ADN y su reparación. En mamíferos, las DSBs que ocurren para la generación de las IGs son debidas a la acción de las proteínas RAG (del inglés, "**R**ecombination- **A**ctivating **G**ene"). Estas proteínas se unen a una secuencia señal de recombinación (RSS, del inglés "**R**ecombination **S**equences **S**ignals") que se encuentran flanqueando los segmentos variables (V), diversos (D) y de unión (J) de las IGs y que se encuentran altamente conservadas en el genoma (Zhang y col., 2010; Malu y col., 2012). Los procesos de generación de la diversidad del receptor de antígenos y de la recombinación por cambio de clase de las IGs han sido ampliamente estudiados y engloban a una gran cantidad de moléculas (Dudley y col., 2005; Soulas-Sprauel y col., 2007). Además de las proteínas RAG, para que estos procesos ocurran han de participar otras proteínas como polimerasas (Gilfillan y col., 1995), nucleasas (Ma y col., 2002) y los componentes de la maquinaria de la vía de reparación por unión de los extremos no homólogos (Zhang y col., 2010; Malu y col., 2012).

1. INTRODUCCIÓN

El otro proceso donde existe una regulación previa de las DSBs es la formación de gametos en meiosis. Aquí, la rotura es efectuada por la enzima Spo11 (Keeney, 2008) y la recombinación y el entrecruzamiento cromosómico que tienen lugar posteriormente, son fundamentales para la generación de variabilidad en los gametos (Lam y Keeney, 2014).

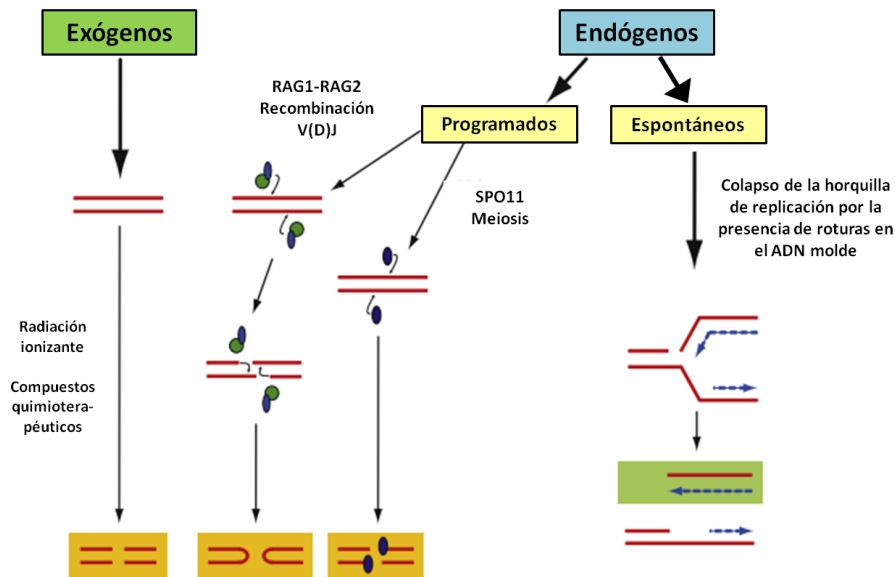


Figura 2. Mecanismo de formación de las DSBs. Las DSBs pueden generarse por causas exógenas o endógenas. En naranja aparecen las exógenas y las endógenas que están programadas genéticamente. En verde, aparecen las roturas que se forman cuando la horquilla de replicación se encuentra con mellas en el ADN molde. Modificado de Chapman y col., 2012.

En las células de mamíferos existen dos vías principales de reparación de las DSBs: una de ellas se caracteriza por ser más rápida pero propensa a introducir errores, conocida como la reparación por unión de extremos no homólogos, (del inglés, “**N**on-**H**omologous **E**nd-**J**oining”, NHEJ) mientras que la otra alternativa, la reparación por recombinación homóloga (del inglés, “**H**omologous **R**ecombination”, RH), requiere más tiempo para su acción, pero es más segura pues no provoca errores (revisado en Gómez y col., 2016). La elección de una vía u otra dependerá de la naturaleza del factor que haya causado la rotura (Goodarzi y Jeggo, 2013), del tipo de procesamiento de los extremos del ADN (Symington y Gautier, 2011; Panier y Durocher, 2013), del momento del ciclo celular en el que se haya producido la rotura, así como del estado de compactación de la cromatina (Chapman y col., 2012).

1.1. Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ).

La NHEJ es la vía de reparación más importante en las fases G0 y G1 del ciclo celular. Este mecanismo promueve la ligación directa de los extremos del ADN que se han quedado al descubierto tras una DSB, sin la necesidad de que exista una cadena molde. Sin embargo, este

tipo de reparación suele cometer errores pudiendo introducir pequeñas inserciones, deleciones o sustituciones en el sitio de la rotura (revisado de Moskwa, 2016). Defectos en la vía NHEJ han sido relacionados con enfermedades como la inmunodeficiencia combinada severa sensible a radiación, el envejecimiento prematuro, microcefalias y retraso en el crecimiento (Zhang y col., 2010; Bunting y Nussenzweig, 2013).

Al igual que en otros procesos de reparación, la NHEJ requiere de nucleasas que eliminen el daño, polimerasas que sinteticen el ADN nuevo, y ligasas que restauren la integridad de las cadenas de ADN (Lieber, 2010). Los componentes principales de esta vía de reparación son: Ku70, Ku80, XRCC4 y LIG4. Estas cuatro proteínas se encuentran altamente conservadas en la evolución entre especies. Además, han sido descritas cuatro proteínas accesorias: ARTEMIS, XLF, DNA-PKcs y PAXX (Ochi y col., 2015). Debido a la gran amenaza que suponen este tipo de roturas para la viabilidad celular, la presencia de una única DSB es suficiente para activar el ensamblaje de estos componentes en el sitio donde se ha producido la lesión (Moskwa, 2016).

La reparación NHEJ es un proceso complejo que ocurre en varias fases (**Fig. 3**). Las proteínas Ku70 y Ku80 (codificadas por los genes *Xrcc5* y *Xrcc6*, respectivamente) una vez detectan la rotura, se ensamblan formando el heterodímero Ku70/80. Este heterodímero se une con una alta afinidad a los extremos rotos del ADN permitiendo su anclaje y manteniendo su cercanía en el genoma (Downs y Jackson, 2004). El complejo Ku70/80 sirve como plataforma donde se unen el resto de proteínas que participan en el mecanismo de la respuesta al daño (Lieber, 2008), además de permitir la unión de otros factores relacionados con la apoptosis (Sawada y col., 2003; Yuan y Seto, 2007), el ciclo celular (Liu y col., 2010), o la interacción con la histona H2AX fosforilada (γ -H2AX) para amplificar la respuesta de reparación del daño (Kinner y col., 2008). Una de las primeras proteínas en ser reclutada por el complejo Ku70/80, es la proteína DNA-PKcs. La interacción de esta proteína con el complejo Ku70/80 hace que éste último se deslice hacia el interior del ADN desde los extremos de la rotura, asumiendo la sujeción de los extremos y estabilizando el ADN dañado. Además, la interacción DNA-PKcs con el ADN induce un cambio conformacional que provoca la activación del dominio quinasa en esta proteína (Hartley y col., 1995) provocando su autofosforilación, así como la fosforilación de otros componentes implicados en la reparación (Davis y Chen, 2014; Jette y Lees-Miller, 2015). DNA-PKcs es una proteína fundamental para la actividad endonucleolítica de Artemis (Ma y col., 2002; Goodarzi y col., 2006; Povirk y col., 2007; Yannone y col., 2008) y para estimular la actividad ligasa del complejo LIG4 (Meek y col., 2008). De forma recíproca, el complejo LIG4 estimula la autofosforilación de DNA-PKcs y la actividad de las polimerasas μ y λ (Lu y col., 2008). Todo ello sugiere un papel fundamental de DNA-PKcs en la fase nucleolítica y en la ligación de los extremos rotos (Lieber, 2010).

1. INTRODUCCIÓN

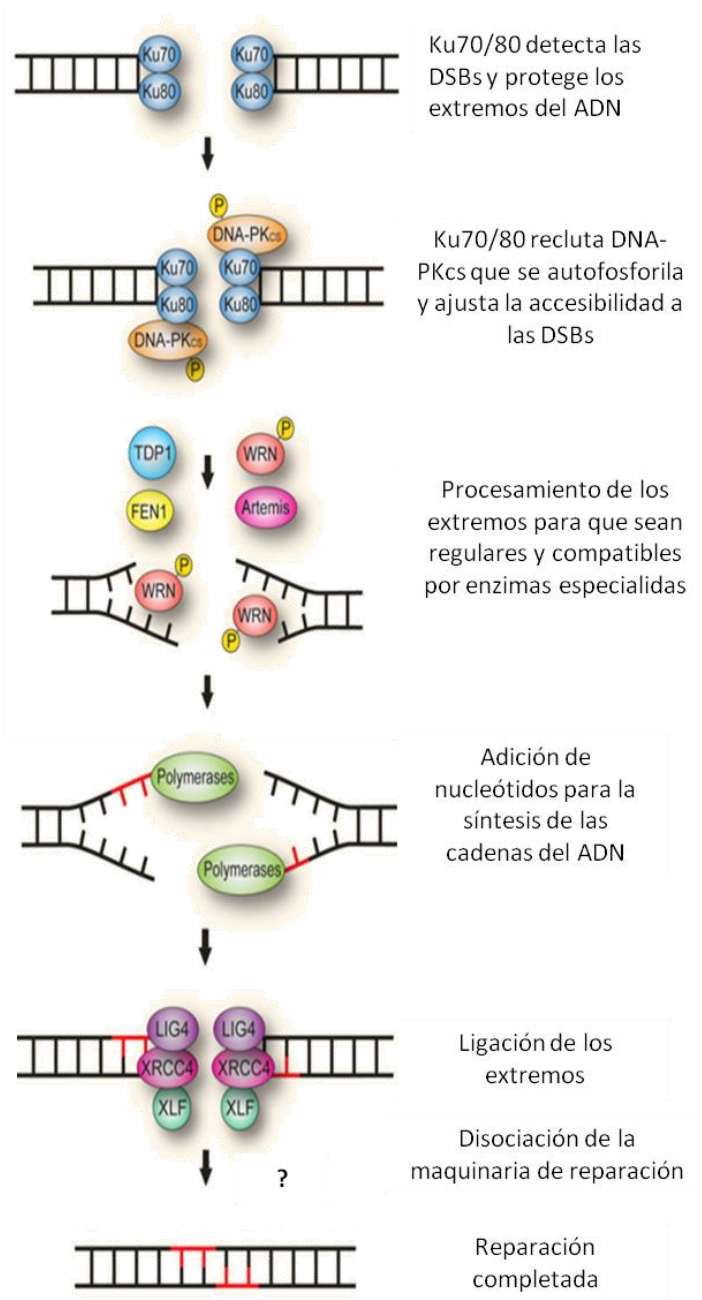


Figura 3. Mecanismo de la reparación NHEJ. Durante la NHEJ Ku70/80 se sitúa sobre la DSB, rodeando la hebra de ADN. Esto provoca el reclutamiento de DNA-PKcs que se autofosforila y permite el procesamiento final de la rotura mediante el ensamblaje de los componentes del complejo LIG4. Modificado de Jeppesen y col., 2011.

1. INTRODUCCIÓN

En la siguiente fase, se requiere que los extremos sean regulares y compatibles para que haya una ligación directa. Para ello se necesita la acción de enzimas especializadas, entre las que destacan: quinasas/fosfatasa (PNK), nucleasas (Artemis, Mre11), polimerasas (ADN polimerasa μ y λ), helicasas (WRN, RECQ1) y fosfodiesterasas (TDP1 y TDP2) (Mahaney y col., 2009; Zeng y col., 2011; Gómez-Herrerros y col., 2013). La nucleasa Artemis corta los salientes de ADN de una sola hebra y abre las estructuras en horquilla (Ma y col., 2002). A continuación, las polimerasas μ y λ rellenan los huecos vacíos. En condiciones fisiológicas, estas enzimas tienen una acción más flexible que otro tipo de polimerasas (Ramadan y col., 2004; Ramsden, 2011). Junto a las polimerasas, para el procesamiento de los extremos finales del ADN es importante la acción de las proteínas TDP1 y TDP2. Estas enzimas reparan los errores que cometen las topoisomerasas I y II, respectivamente (Mahaney y col., 2009; Gómez-Herrerros y col., 2013) en la resolución de las tensiones topológicas que ocurren en la replicación y transcripción del ADN.

La tercera fase de la reparación NHEJ consiste en la ligación de los extremos por el complejo LIG4, constituido por la ADN Lig IV, XRCC4 y XLF, restableciendo así la integridad de la molécula del ADN. Los componentes del complejo LIG4 pueden actuar de forma independiente, pero si lo hacen conjuntamente y en presencia del complejo Ku70/80, la eficiencia de la ligación es mucho mayor (Gu y col., 2007).

Una vez resuelta la rotura, la maquinaria de reparación de la NHEJ debe disociarse del ADN. La disociación de algunos de los componentes de la maquinaria de reparación podría ocurrir por modificaciones secundarias como fosforilaciones y permitiendo ser reciclados, mientras que otros podrían ser degradados por un proceso dependiente de ubiquitinación (Deriano y Roth, 2013).

La importancia biológica de los componentes que forman la vía de reparación NHEJ ha sido posible gracias a la generación de animales y líneas celulares deficientes para las proteínas implicadas en este proceso. Los ratones deficientes en Ku70 o en Ku80 demostraron que ambas son necesarias para la viabilidad del organismo ya que presentan alteraciones en el crecimiento y el síndrome de inmunodeficiencia severa combinada, debido a la incapacidad para generar las inmunoglobulinas. Además, los fibroblastos embrionarios carentes de estas proteínas mostraron radiosensibilidad y una senescencia prematura provocada por la acumulación del daño en el ADN (Nussenzweig y col., 1996; Zhu y col., 1996; Gu y col., 1997). En cuanto a la proteína DNA-PKcs, los ratones mutantes nulos para esta proteína son viables pero tienen una predisposición a desarrollar linfomas en el timo e inmunodepresión (Jhappan y col., 1997; Smith y Jackson, 1999). Por último, la eliminación de la ADN Lig IV o XRCC4 en ratones resulta letal en estado embrionario (Frank y col., 1998). Sin embargo, el ratón mutante nulo para XLF sí es viable, de tamaño normal y capaz de generar inmunoglobulinas correctamente (Li y col., 2008).

1.2. Recombinación homóloga (RH).

La reparación por recombinación homóloga (RH) es un mecanismo que se encuentra altamente conservado en todos los organismos. Sus principales funciones son la protección y reactivación de la horquilla de replicación que ha quedado bloqueada (Guirouilh-Barbat y col., 2014; Magdalou y col., 2014), el rellenado de huecos en las roturas que han tenido lugar en una cadena del ADN (del inglés “Single-Stranded DNA”, ssDNA), y en la reparación de las DSBs (Mehta y Haber, 2014). Además, la RH es necesaria para la generación de nuevas combinaciones de material genético o para la eliminación de mutaciones. Es por eso que este tipo de mecanismo ha de estar finamente regulado para conseguir un equilibrio entre la estabilidad y la variabilidad genómica (revisado de Gelot y col., 2016). La RH ocurre específicamente en las fases tardías S y G2 del ciclo celular. Para llevar a cabo la reparación, necesita de una secuencia homóloga que no esté dañada como molde, lo que le confiere precisión en la reparación de las DSBs del ADN (Johnson y Jasin, 2000; Kass y Jasin, 2010).

El proceso de RH ocurre en varias fases (**Fig. 4**). La rotura es detectada por el complejo MRN (compuesto por las proteínas **M**RE11, **R**AD50 y **N**BS1 (Stracker y Petrini, 2011)), en cooperación con la proteína quinasa ATM (**A**taxia **T**elangiectasa- **M**utada) (Lavin, 2007; Lee y Paull, 2007). Posteriormente, el complejo MRN se asocia con la proteína CtBP-CtIP (del inglés “**C**-terminal, **B**inding **P**rotein (CtBP)-**I**nteracting **P**rotein (CtIP)”) y la exonucleasa EXO1 para generar los extremos 3' sobresalientes que facilitan la interacción con el complejo RAD51 recombinasa (Sartori y col., 2007; Nimonkar y col., 2008; Gravel y col., 2008). Este complejo está compuesto por RAD51 y sus parálogos (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 y XRCC3), RAD52 y RAD54 (Lee y McKinnon, 2007). BRCA2 también es esencial en la RH pues participa en la función de RAD51 (Pellegrini y col., 2002; West, 2003). Tras la carga de RAD51 y sus proteínas accesorias, la hebra de ADN invade la cromátida hermana, migrando a través de ella mediante RAD54 (Goodarzi y Jeggo, 2013), en búsqueda de microhomologías que promuevan el emparejamiento homólogo (Qi y col., 2015). Esto genera estructuras intermedias en el ADN en forma de cruz que posteriormente, serán eliminadas por nucleasas como GEN1, helicasas (Ip y col., 2008), o por la acción de la topoisomerasa III en conjunto con Rmi2 (Singh y col., 2008).

No obstante, ambas vías de reparación (NHEJ y RH) pueden cooperar en la reparación de la DSB estando activas simultáneamente (Richardson y Jasin, 2000). Estas dos vías de reparación son esenciales para la vida, ya que los estudios con ratones mutantes nulos para algunos de los componentes de cualquiera de las vías (Rad51, BRCA2, XRCC2, LIG4 y XRCC4) muestran una tasa alta de muerte durante la embriogénesis (Pierce y col., 2001; Prakash y col., 2015). Otro ejemplo de la colaboración entre ambas vías viene dado por estudios de dobles mutantes para componentes de ambas vías. Por ejemplo, el ratón mutante nulo para Rad54 y Ku80 tiene baja tasa de supervivencia, alta sensibilidad a radiaciones y alta acumulación de las

DSBs no reparadas (Couedel, 2004). Sin embargo, si estas proteínas se inactivan por separado, los ratones sí son viables.

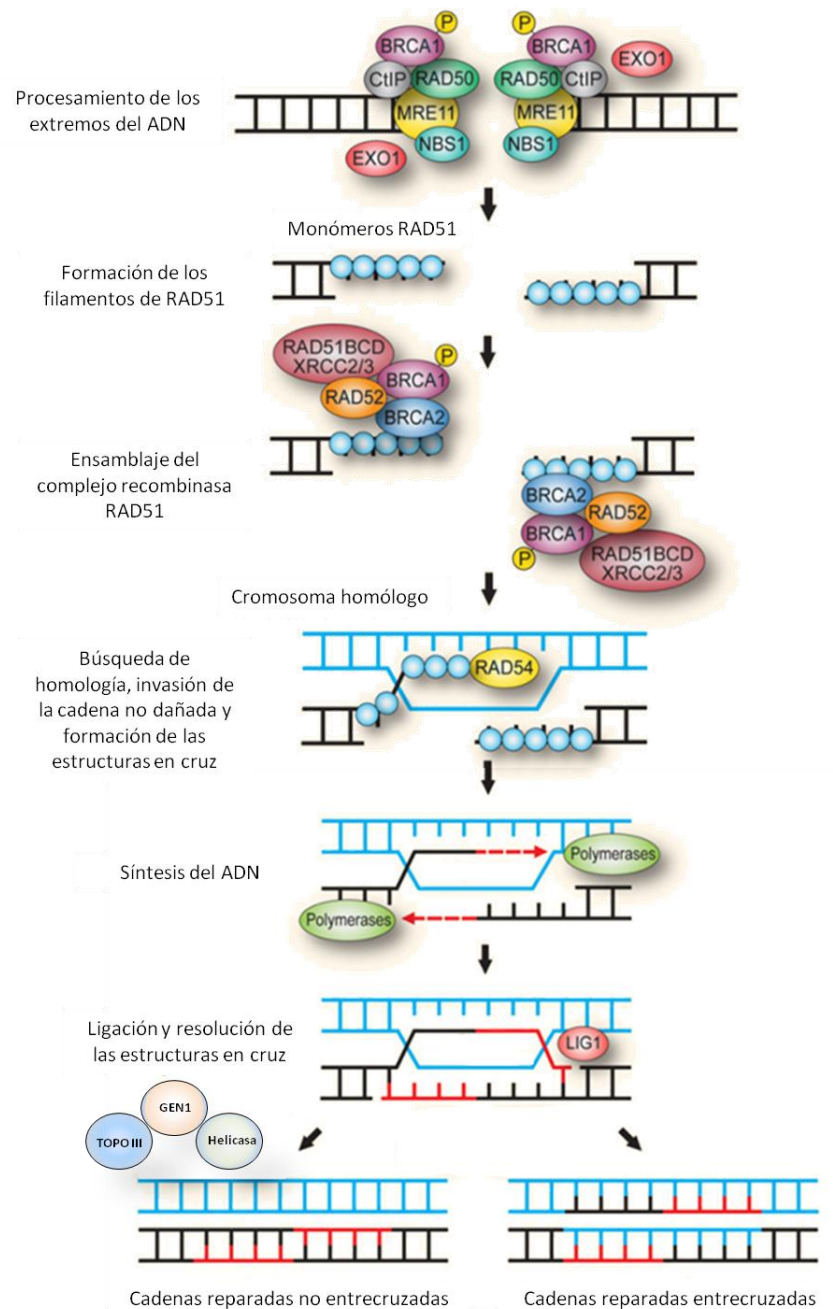


Figura 4. Mecanismo de la reparación por RH. Durante la RH, la resección es iniciada por MRN y CtIP y continuada por Exo1. Esto genera una cadena única con el extremo 3' libre donde se unen monómeros de RAD51. Posteriormente se une el complejo RAD51 recombinasa, compuesto por BRCA1, BRCA2, RAD52 y los parálogos de RAD51. Este complejo junto con el factor RAD54, invaden la cadena de ADN que no está dañada y facilitan la búsqueda de homología en el ADN de la cromátida hermana, formando las estructuras intermediarias en forma de cruz. Para terminar, las ADN ligasas sellan las roturas. Modificado de Jeppesen y col., 2011.

2. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS ROTURAS EN EL ADN.

Para reparar una lesión del ADN, la célula debe elegir la vía de reparación más adecuada además de coordinar este proceso con otros que utilicen el mismo molde cromosómico (Aguilera y García-Muse, 2013). El punto crítico para la elección del mecanismo de reparación de las DSBs, parece residir en cómo se procesan y eliminan los extremos que quedan libres en el ADN (Symington y Gautier, 2011). La regulación de la resección de los extremos influye en el remodelado de la cromatina, las modificaciones de histonas, la formación del heterodímero Ku70/80 y la activación de los adaptadores de puntos de control como 53BP1 (Symington, 2014) (Fig. 5).

Como se mencionó anteriormente, la interacción del complejo MRN con ATM provoca la unión de los complejos de reparación a los sitios de DSBs. Entre las proteínas diana de ATM se encuentra la histona H2AX. ATM fosforila a la histona H2AX en la serina 139, generando γ -H2AX. Esta fosforilación ocurre en tan solo un minuto después de la exposición a la radiación ionizante, por lo que la aparición de γ -H2AX se considera un factor de respuesta temprana a las DSBs (Thompson, 2012). La formación de γ -H2AX es debida principalmente a la acción de ATM, pero también puede estar mediada por DNA-PKcs y ATR (Stiff y col., 2004). La fosforilación de H2AX sirve como señal de la presencia de roturas en el ADN iniciando fosforilaciones en las histonas H2AX adyacentes, pudiendo propagarse varias megabases alrededor de la rotura (Rogakou y col., 1998; Price y D'Andrea, 2013). Además, las fosforilaciones en las histonas H2AX, provocan el reclutamiento de diferentes complejos proteicos de reparación de las roturas y de señalización en la cromatina dañada (Lukas y col., 2011). La formación de γ -H2AX está muy conservada en los eucariotas (Downs y col., 2000). En mamíferos, los focos γ -H2AX aparecen preferencialmente en la euromatina, sugiriendo que las lesiones en la heterocromatina pueden estar señalizados por mecanismos independientes de la activación de γ -H2AX (Cowell y col., 2007).

La formación de γ -H2AX facilita el ensamblaje de MDC1 (Lou y col., 2006). Esta proteína puede reclutar proteínas efectoras como las ubiquitin ligasas RNF8, RNF168 y HERC2 (Lavin, 2008; Stewart y col., 2009; Doil y col., 2009; Bekker-Jensen y col., 2010; Goodarzi y Jeggo, 2013). Estas dos últimas proteínas ubiquitinan la histona H2A en las proximidades de la DSB además de modificar a otras proteínas involucradas en la respuesta al daño como el complejo Ku70/80 (Moyal, 2011; Feng y Chen, 2012), BRCA1 y 53BP1 (Kolas y col., 2007; Doil y col., 2009). De forma similar a la extensión de γ -H2AX, la ubiquitinación de la cromatina puede extenderse hasta 10 kilobases más allá de donde se ha producido la rotura (Xu y col., 2010).

Una de las proteínas reclutadas como consecuencia de la ubiquitinación de la histona H2A y de la fosforilación de la H2AX, es 53BP1 (Botuyan y col., 2006; Mallette y col., 2012).

1. INTRODUCCIÓN

Esta proteína es indispensable para el mantenimiento de la actividad de ATM en los extremos de las DSBs, promoviendo la relajación de la heterocromatina y deteniendo el ciclo celular (Shibata y col., 2010). Además, 53BP1 está implicada en otros procesos como son la reparación de los telómeros (Dimitrova y col., 2008), la recombinación V(D)J (Difilippantonio y col., 2008) y en la recombinación por cambio de clase de las Igs (Manis y col., 2004). En los últimos años 53BP1 ha sido identificada como el principal regulador en la elección de la vía de reparación, promoviendo la NHEJ y restringiendo la RH (Goodarzi y Jeggo, 2013).

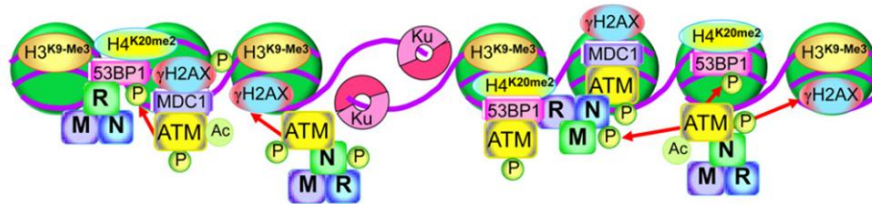


Figura 5. Modelo general de la señalización de las DSBs. Principales componentes de la señalización y reparación de las DSBs. 53BP1 es reclutado por la cascada de modificaciones que parten de la fosforilación de H2AX, además de promover el reclutamiento de MRN y ATM en el sitio de la DSB. Modificado de Thompson, 2012.

Al igual que en otros casos de ratones mutantes nulos para componentes de reparación del ADN, los ratones deficientes para la proteína 53BP1 muestran hipersensibilidad a las radiaciones ionizantes, retraso en el crecimiento, inmunodeficiencias, anomalías cromosómicas y propensión a desarrollar cáncer (Morales y col., 2003; Ward y col., 2003).

Otro proceso que genera roturas en el ADN del tipo DSB son las inserciones de novo de los transposones, elementos móviles que existen en el genoma de las células. Así, las DSBs son necesarias para que los elementos móviles del genoma se integren en una localización diferente, en un mecanismo conocido como transposición (Suzuki y col., 2009). Diversos estudios muestran que las proteínas de reparación del ADN que están codificadas en la célula huésped, entre ellas ATM (Gasior y col., 2006), la endonucleasa ERCC1/XPF (Gasior y col., 2008) y las proteínas de la vía de reparación NHEJ (Suzuki y col., 2009), podrían ser necesarias para modular la transposición de ciertos elementos móviles (Gasior y col., 2006 y 2008; Beaugregard y col., 2008;).

3. TRANSPOSICIÓN DE ELEMENTOS MÓVILES EN EL GENOMA

En los últimos años se ha estudiado con gran interés los elementos transponibles del genoma como mecanismo fundamental de la complejidad y evolución de los organismos (Ostertag y Kazazian, 2001; Kazazian, 2004). Estos elementos ocupan una gran área genómica, llegando a representar el 45% del genoma total en los humanos y un 37% en el ratón (Waterston y col., 2002; Lander y col., 2001).

Los elementos transponibles tienen la habilidad de integrarse en un nuevo sitio del genoma en la célula de origen. Como consecuencia de la integración, estos elementos pueden modular la expresión génica pudiendo incluso inactivarla, además de producir alteraciones genéticas importantes como inserciones, escisiones, duplicaciones o translocaciones en el sitio donde se integran (Muñoz-López y García-Pérez, 2010). Por ejemplo, los transposones de ADN pueden inactivar o alterar la expresión génica debido a su inserción dentro de los intrones, de los exones o de las regiones reguladoras (Jordan y col., 1968; Rubin y col., 1982; Kazazian y col., 1988; Clegg y Durbin, 2003; Lerman y Feder, 2005). Además, los elementos transponibles participan en la reorganización del genoma por movilización de los elementos no autónomos (Moran y col., 1999; Prak y Kazazian, 2000; Sayah y col., 2004) o actuando como sustratos de recombinación que provocan diferentes tipos de alteraciones cromosómicas (Kidwell y Lisch, 2001).

Los elementos transponibles y las células hospedadoras han desarrollado estrategias para minimizar el impacto perjudicial de la transposición y alcanzar el equilibrio (Muñoz-López y García-Pérez, 2010). Por ejemplo, algunos transposones tienden a insertarse en regiones no esenciales del genoma, como en la heterocromatina, para causar el mínimo impacto (Kidwell, 1994; Pimpinelli y col., 1995; Dimitri y col., 1997; Ikeda y col., 2007; Biemont, 2009). Por otro lado, las células hospedadoras han desarrollado mecanismos de defensa contra las tasas altas de actividad de transposición, tales como las metilaciones en el ADN (Dennis y Brettell, 1990; Barlow, 1993; Yoder y col., 1997), los ARN interferentes (Obbard y col., 2009) y la inactivación de la actividad del transposón por la acción de proteínas específicas (Schumann, 2007; Stetson y col., 2008).

En las células de mamíferos los elementos transponibles son clasificados atendiendo al tipo de intermediario que utilizan para su movilización (Beck y col., 2011) (**Fig. 6**).

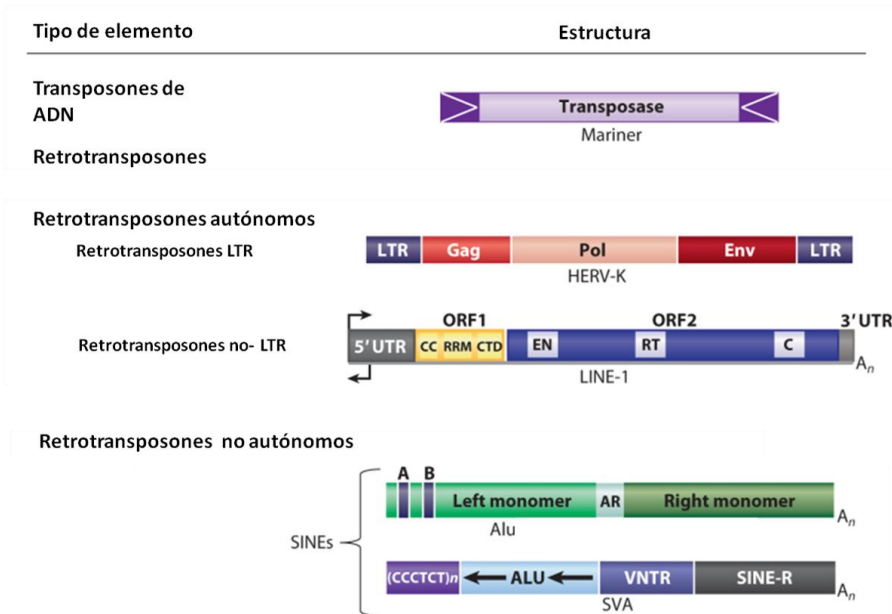


Figura 6. Estructura de los elementos transponibles de mamíferos: Transposones de ADN y Retrotransposones. Representación del elemento móvil y la estructura de cada uno de ellos. Las abreviaturas: HERV-K, retrovirus-K humano endógeno; LTR, repetición terminal larga; Gag, antígeno específico de grupo; Pol, polimerasa; Env, proteína de la envoltura; UTR, región no traducida; CC, coiled coil; RRM, motivo de reconocimiento del ARN; CTD, dominio carboxilo terminal; EN, endonucleasa; RT, transcriptasa inversa; C, dominio rico en cisteína; A y B, componentes de la secuencia del promotor de la ARN polimerasa III; AR, segmento rico en adenosina; VNTR, repeticiones en tándem de número variable; SINE-R, dominio derivado del HERV-K; A_n cola poliA. Modificado de Beck y col., 2011.

3.1. Transposones de ADN.

Estos elementos transponibles se encuentran ampliamente representados en diferentes taxones de organismos desde bacterias a vertebrados (Kleckner, 1990; Ding y col., 2005; Arkhipova y Meselson, 2005; Muñoz-López y col., 2008; Lazarow y col., 2013). Se mueven a través de un mecanismo de “corte y pegado” (Mizuuchi, 1992; Smit y Riggs, 1996), donde la transposasa (proteína que se encuentra codificada en el propio transposón) se une a las secuencias de repetición invertida de éste, “corta” el transposón de su localización existente y lo “pega” en una nueva localización (Craig y col., 2002; Richardson y col., 2006). En los genomas de los eucariotas superiores tienen una vida útil muy limitada (Lander y col., 2001) encontrándose inactivos en la mayoría de mamíferos, a excepción de ciertas especies de murciélagos (Mitra y col., 2013). En humanos los transposones de ADN han sido descritos como los precursores de las proteínas activadoras de la recombinación V(D)J, RAG1 y RAG2 (Zhou y col., 2004; Kapitonov y Jurka, 2005). Los transposones de ADN han sido ampliamente utilizados en estudios de ingeniería genética como vectores en terapia génica (Ivics y col., 1997; Cohen y col., 2009; Ivics y col., 2009; Hackett y col., 2010) o para la generación de mutantes nulos en células embrionarias de ratón (Ding y col., 2005; Sun y col., 2008).

3.2. Retrotransposones.

Estos elementos codifican para una transcriptasa inversa y se mueven mediante un mecanismo “copia y pegado” que requiere de un intermediario de ARN (Beck, 2011). Representan aproximadamente, el 42% del genoma humano (Lander y col., 2001).

Los retrotransposones se clasifican en dos tipos: no autónomos y autónomos. Los retrotransposones no autónomos requieren de la actividad de las proteínas codificadas por los autónomos para su movilidad. En humanos encontramos los elementos Alu y los SVA (Rowold y Herrera, 2000; Kazazian, 2004). Por el contrario, los retrotransposones autónomos codifican las proteínas necesarias para su movilidad. Dentro de éstos encontramos los retrotransposones LTR, llamados así por las repeticiones terminales largas que flanquean sus secuencias (Stocking y Kozak, 2008; Mager y Stoye, 2015), y los que no presentan esas repeticiones (no-LTR). Los retrotransposones LTR son similares estructuralmente a los retrovirus pero no presentan un gen env funcional. Incluyen a los elementos como las partículas A-intracisternales de ratón (IAPs) (Kuff y Lueders, 1988; Maksakova y col., 2006; Zhang y col., 2008), y a los retrovirus humanos endógenos (HERVs) (Benit y col., 1999). En cuanto a los no-LTR, estos elementos son los más antiguos y abundantes en los organismos multicelulares (Kapitonov y col., 2009), llegando a representar el 21% del genoma humano. El más importante es el elemento LINE-1.

LINE-1 (L1) es el elemento móvil más activo en el genoma de humanos llegando a representar el 17% del genoma total (Goodier, 2016; Muñoz-López y col., 2016), pese a que solamente entre 80-100 copias son activas (Beck y col., 2011). L1 consiste en una secuencia de 6kb de longitud en la que se identifican las siguientes partes: una región no traducida en el extremo 5' (UTR, del inglés “UnTranslated Region”), dos regiones codificantes (ORFs, del inglés “Open Reading Frames”) y una región UTR en el extremo 3' seguida de una cola de poliadenilación, poliA (Beck y col., 2011). La región 5'UTR contiene el promotor responsable de la expresión de L1 (Swergold, 1990) y una isla CpG que regula su expresión (Bourc'his y Bestor, 2004; Wissing y col., 2012). Además alberga un promotor conservado antisentido con respecto al anterior (Macia y col., 2011) que se ha relacionado con la autorregulación de L1 por la generación de ARNs de interferencia (Yang y Kazazian, 2006; Ciaudo y col., 2013; Li y col., 2014). ORF1 y ORF2 codifican para una proteína de unión al ARN y para una proteína endonucleasa y transcriptasa inversa, respectivamente (Moran y col., 1996; Macia y col., 2015). Ambas proteínas son esenciales para la retrotransposición de L1 (Moran y col., 1996; Beck y col., 2011). Tras la traducción, el ARN de L1 se ensambla gracias a la actividad de sus propias proteínas codificadas y se dirige al núcleo, donde, debido a su actividad endonucleasa, provoca un corte en una de las cadenas del ADN genómico (**Fig. 7**). Esta cadena que queda libre es utilizada por la transcriptasa inversa para iniciar la transcripción inversa del ARN de L1 dando lugar a la integración en una nueva posición del genoma (Wei y col., 2001). Este proceso

1. INTRODUCCIÓN

es conocido como TPRT (del inglés, “Target site Primed Reverse Transcription”). En la mayoría de los casos, la transcripción inversa falla en el extremo 5', dando como resultado inserciones de L1 no funcionales. Así, se ha estimado que el 99,9% de las inserciones de L1 son inactivas debido a la aparición de secuencias truncadas, inversiones y/o mutaciones puntuales dentro de los dos ORFs codificados en L1 (Ostertag y Kazazian, 2001).

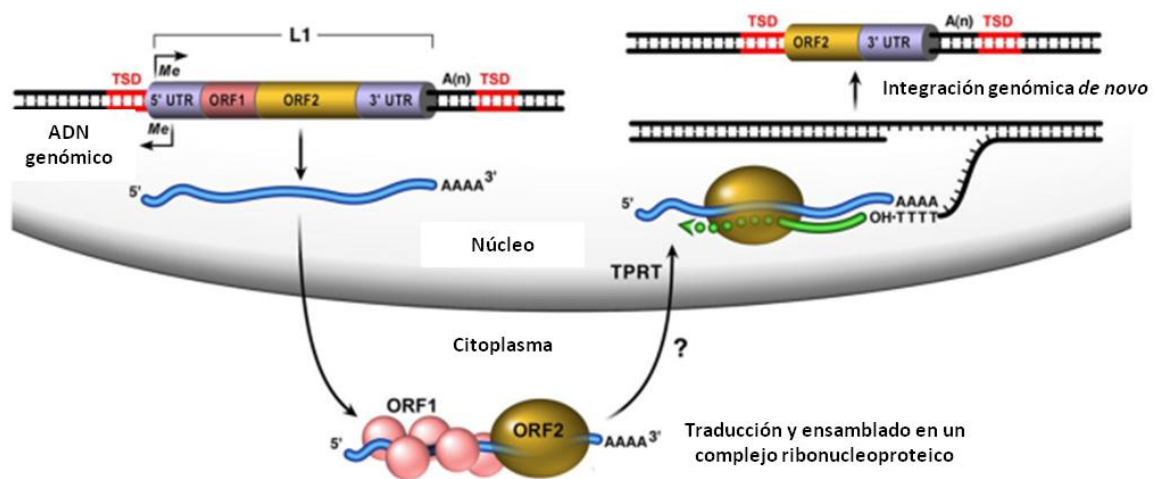


Figura 7. Ciclo de retrotransposición de LINE-1. La transcripción de L1 está reprimida por metilación de la isla CpG en su promotor. Tras su activación, L1 se transcribe a ARNm (línea azul) y se exporta desde el núcleo al citoplasma, donde se traduce y se ensambla junto a proteínas que codifica. Una vez formados los complejos ribonucleoproteicos son re-importados al núcleo. El ARN de L1 se reinserta en el genoma mediante un mecanismo denominado TPRT (del inglés, “Target site Primed Reverse Transcription”). Así, la endonucleasa produce un corte en una cadena del ADN donde la transcriptasa inversa se une y realiza la transcripción inversa desde el extremo 3' del ARN de L1. Frecuentemente, la transcripción inversa da lugar a inserciones truncadas inactivas. Modificado de Singer y col., 2010.

En las células de mamíferos la sobreexpresión de L1 ha sido relacionada con la apoptosis, la progresión de tumores, eventos de plasticidad celular, respuesta al estrés y a mecanismos de reparación del daño del ADN (Morrish y col., 2002; Belgnaoui y col., 2006; Sinibaldi-Vallebona y col., 2006; Hedges y Deininger, 2007; Morrish y col., 2007). Además, el ARNm de L1 puede transferirse al cigoto provocando que la retrotransposición ocurra en el desarrollo y por tanto se genere variabilidad genómica en la progenie resultante (Beck y col., 2011). Por último, la retrotransposición de L1 se ha relacionado con la generación de la diversidad neuronal (Muotri y col., 2005 y 2010; Coufal y col., 2009).

II. PAPEL DE LAS REORGANIZACIONES GENÓMICAS Y DEL METABOLISMO DEL ADN EN EL SISTEMA NERVIOSO.

1. MOSAICO GENÉTICO EN EL CEREBRO.

La complejidad del cerebro humano se debe a la extrema diversidad de neuronas, tanto morfológicamente como molecularmente, y a las conexiones que estas realizan (Muotri y Gage, 2006). De hecho, se ha demostrado que la capacidad de realizar funciones cognitivas de alto nivel está directamente influenciada por la capacidad de memoria individual, la complejidad cerebral y la actividad neuronal (Vogel y Machizawa, 2004). La diversidad de las neuronas individuales es clave para establecer el funcionamiento de los circuitos neuronales.

El término de mosaico genético somático neuronal se ha acuñado para referirse al hecho de que las neuronas dentro de un organismo tienen diferentes genomas (Paquola y col., 2017). La generación del mosaico es un proceso normal en el funcionamiento del cerebro de individuos sanos; pero cuando se descontrola, puede contribuir a la aparición de enfermedades relacionadas con el neurodesarrollo, con el envejecimiento neuronal y/o con trastornos neuropsiquiátricos (Veltman y Brunner, 2012; O'Roak y col., 2012; Bedrosian y col., 2016).

El mosaico genético neuronal es el resultado de las alteraciones en el genoma neuronal de un organismo. Cada neurona individual tiene una historia de crecimiento, división celular, diferenciación, exposición a agentes químicos o a estrés metabólico y el daño en el ADN cuya reparación conducen a la acumulación de mutaciones (Paquola y col., 2017). En el sistema nervioso central de los mamíferos, entre las mutaciones que contribuyen a la generación del mosaico genético se incluyen: aneuploidías (Bushman y Chun, 2013), variaciones de un solo nucleótido (Lodato y col., 2015) e inserciones de los elementos transponibles (Muotri y Gage, 2006). El análisis del genoma de células únicas en el cerebro de humanos revela que hasta la tercera parte de los progenitores neuronales presentan aneuploidías, que aproximadamente un 40% de las neuronas contienen variantes en el número de copias, que existen hasta un 80% de transiciones C-T en los genes que se transcriben activamente, y que existen variabilidad en el número de inserciones de retrotransposones, entre ellos LINE-1 (Lodato y col., 2015; Bedrosian y col., 2016). Por tanto, el mosaico genético neuronal podría tener un amplio espectro de actuación ya que en función de la alteración que ocurra se puede afectar la funcionalidad de las redes neuronales lo que podría ser fundamental en el comportamiento y las capacidades cognitivas de cada individuo (Paquola y col., 2017).

1. INTRODUCCIÓN

Entre los factores que contribuyen a la formación del mosaico genético destacan: las células (identidad y tipo celular además de a la región cerebral a la que pertenece), los individuos (fondo genético, historia médica, comportamiento), variaciones (tipo de variación y regiones afectadas) y cuándo se producen (desarrollo, adulto o en el envejecimiento) (Fig. 8).

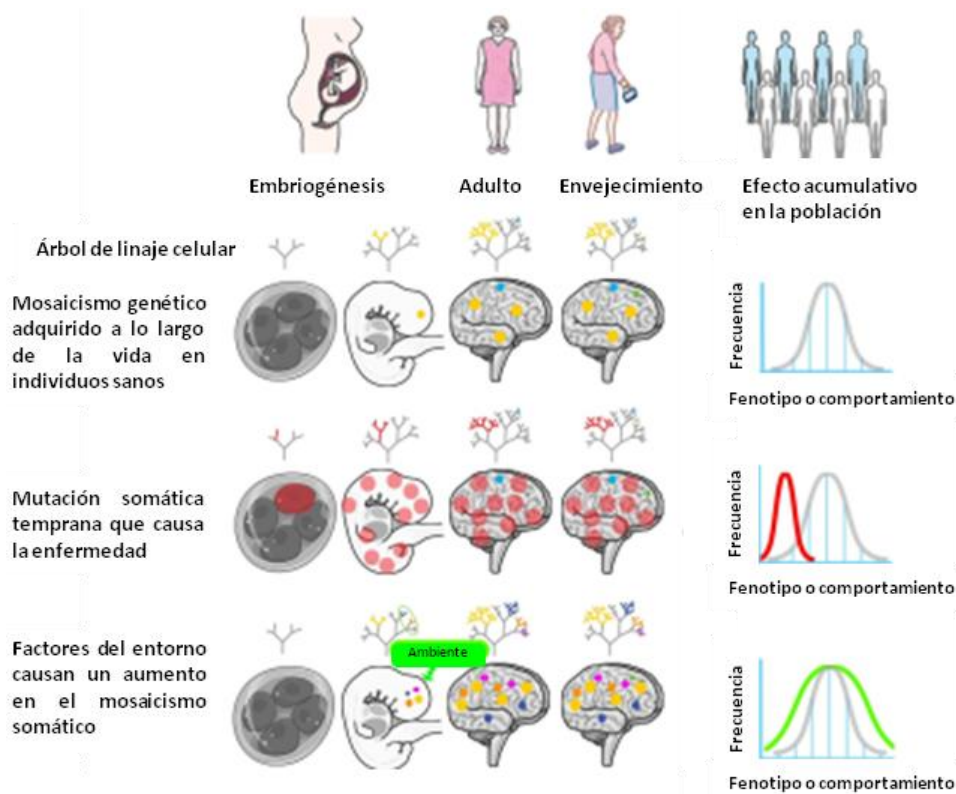


Figura 8. Variaciones somáticas adquiridas durante la vida de los individuos. Los árboles representan el linaje celular y los colores representan las variantes somáticas. En individuos sanos (panel de arriba), las variaciones somáticas ocurren de forma moderada durante el desarrollo y durante toda la vida. En una amplia población, este mosaico conduce a variación de fenotipos o comportamientos (Muotri y Gage., 2006). Cuando una mutación ocurre en el desarrollo y causa enfermedad (panel medio), da como resultado una gran proporción de células con esa variante perjudicial. También es importante el efecto de los factores ambientales en las tasas de mutaciones somáticas a lo largo de la vida del individuo (panel inferior). En una población, las diferencias en el mosaico neuronal pueden generar una mayor variedad de fenotipos o comportamientos (línea verde). Modificado de Paquola y col., 2017.

2. RETROTRANSPOSICIÓN DE L1 EN EL CEREBRO.

La retrotransposición de LINE-1 (L1) ha sido postulada como uno de los posibles candidatos responsable de la generación de la diversidad neuronal (Muotri y Gage, 2006).

La inserción de L1 provoca el remodelado del genoma en ciertas áreas cerebrales mediante reajustes somáticos que ocurren individualmente en los progenitores neuronales (Singer y col., 2010). Por tanto, las variaciones somáticas del genoma podrían contribuir a la expansión de la heterogeneidad celular y aumentar así la diversidad funcional del cerebro de los mamíferos (Muotri y Gage, 2006; Bushman y Chun, 2013).

La actividad de L1 ha sido descrita en los progenitores neuronales (Muotri y col., 2005; Coufal y col., 2009) que se encuentran en la última fase de la diferenciación neuronal (Muotri y col., 2010) y más recientemente en las células gliales (Erwin y col., 2016). En las células madre neuronales (**Fig. 9**), L1 se encuentra silenciado debido a la represión que ejerce el complejo SOX2-HDAC1-H3K9me3 (Muotri y col., 2005) y la metilación mediada por MeCP2 del promotor de L1 (Muotri y col., 2010). A medida que la célula madre neuronal se va diferenciando, la expresión de SOX2 va disminuyendo. Esto causa un estado abierto de la cromatina que provoca que el promotor de L1 se desmetile y los complejos represores se disocien de él (Thomas y col., 2012). En este momento, en el progenitor neuronal, los factores de transcripción WNT, YY1, β -catenina y los miembros de la familia TCF/LEF activan la transcripción de L1 y la retrotransposición (Erwin y col., 2014). Existe la posibilidad de que L1 se inserte en los genes neuronales y esto ha sido descrito como un posible mecanismo de generación de la diversidad neuronal.

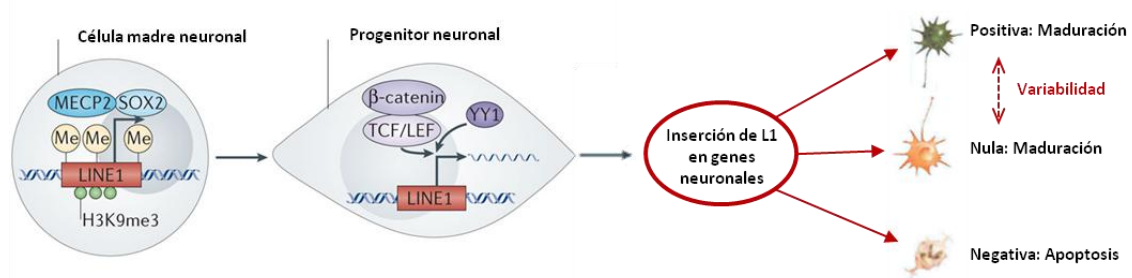


Figura 9. Modelo de la generación de la diversidad neuronal por la retrotransposición de L1. En las células madre neuronales, el promotor de L1 se reprime por metilación del ADN, modificaciones de H3K9me3, MeCP2 y SOX2. En los progenitores neuronales, SOX2 ya no está presente lo que hace que L1 se desmetile y se active la transcripción debido a los factores de transcripción WNT, YY1, β -catenina y los miembros de la familia TCF/LEF. El aumento de la transcripción de L1 provoca la activación de la retrotransposición, pudiendo insertarse en genes neuronales. El resultado de las inserciones puede alterar la expresión génica influyendo en el fenotipo de la célula resultante o desencadenando la apoptosis neuronal. Modificado de Erwin y col., 2014.

1. INTRODUCCIÓN

Como ya se describió anteriormente, los factores ambientales contribuyen a la generación de la diversidad en las neuronas, pudiendo alterar el tamaño de éstas, la complejidad del árbol dendrítico y el número de sinapsis (van Praag y col., 2000). Además, el ambiente puede aumentar la tasa de retrotransposición de L1 (Erwin y col., 2014) debido a la afectación de los procesos celulares y moleculares que actúan en los diferentes niveles del ciclo de inserción (**Fig. 10**). Así, los factores ambientales pueden alterar:

- La transcripción de L1: alteración de la estructura de la heterocromatina, la metilación del ADN o la expresión y/o unión de los factores de transcripción.
- La traducción de las proteínas codificadas por L1: alteración de la cantidad de complejos ribonucleoproteicos, RNP, disponibles para la importación al núcleo.
- La importación al núcleo: alteración de la permeabilidad nuclear o de la tasa de división celular.
- La transcripción inversa e inserción del nuevo elemento: causando roturas en el ADN, la apertura de la cromatina o reduciendo los mecanismos de reparación.

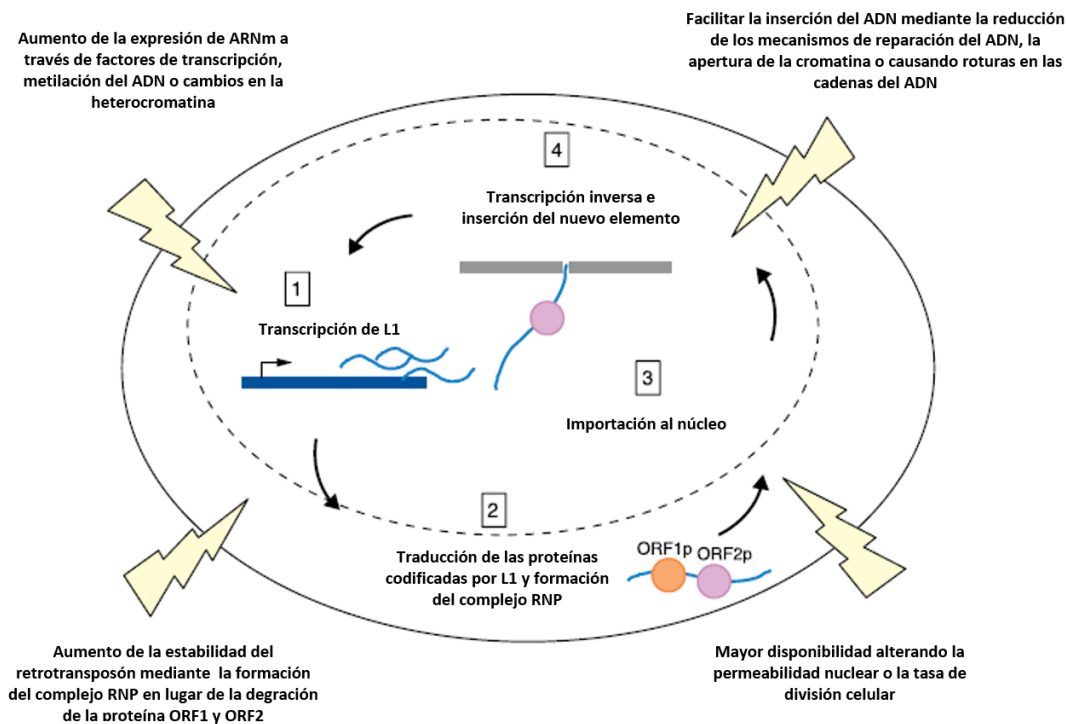


Figura 10. Influencia del ambiente en la retrotransposición del elemento LINE-1. Los factores ambientales pueden aumentar la tasa de retrotransposición al afectar los procesos celulares y moleculares que actúan en los diferentes niveles del ciclo de inserción: (1) transcripción de L1, (2) traducción de las proteínas codificadas por L1 y formación del complejo ribonucleoproteico (RNP), (3) importación al núcleo y (4) transcripción inversa e inserción del nuevo elemento. Modificado de Bedrosian y col., 2016.

Diversos estudios muestran que ciertos factores ambientales como el estrés (Ponomarev y col., 2010; Hunter y col., 2012), el consumo de alcohol y de cocaína (Maze y col., 2011; Ponomarev y col., 2012) o el ejercicio físico (Muotri y col., 2009) pueden alterar la expresión de L1 en el cerebro adulto. Además, el aumento en el número de inserciones L1 también se ha relacionado en ciertas enfermedades mentales como en la esquizofrenia y en el síndrome de Rett (Muotri y col., 2010; Bundo y col., 2014).

3.- ROTURAS Y REPARACIONES DEL ADN NEURONAL.

La acumulación de las roturas en el ADN neuronal, acompañado de la atenuación en las reparaciones, han sido ligadas al envejecimiento y al deterioro cognitivo (Borgesius y col., 2011). Además, se ha considerado como un factor que contribuye a la aparición y desarrollo de la enfermedad de Parkinson y Alzheimer (Nospikel y Hanawalt, 2003; Huang y col., 2010). Sin embargo, las roturas en el ADN neuronal no pueden ser consideradas únicamente como un factor patológico. Suberbielle y colaboradores, demostraron que la exploración de un nuevo entorno (un protocolo ampliamente estudiado como modelo de activación neuronal y de codificación de nueva información) provoca lesiones en el ADN de las neuronas en ratones adultos. En concreto, las roturas que producía la exploración del entorno nuevo eran del tipo DSBs y éstas ocurrían en varias regiones del cerebro, aunque de forma más abundante en el giro dentado del hipocampo (Suberbielle y col., 2013). Esto sugiere que la formación de las DSBs podría ocurrir como parte de la respuesta normal a la activación neuronal (Sharma y col., 2015) y que podría ser necesaria para facilitar la remodelación de la cromatina y regular así la expresión de los genes relacionados con el aprendizaje y la memoria (Herrup y col., 2013).

En relación esto, dos de los genes que se expresan tras la activación neuronal dependiente de la exploración de un nuevo entorno son los factores de transcripción temprana c-Fos y Egr-1 (Guzowski y col., 2005; Alberini, 2009). Recientemente, ha sido descrito que la actividad neuronal desencadena la formación de DSBs en el ADN, en los promotores de los genes de respuesta temprana, sugiriendo que las DSBs en el ADN están asociadas a la transcripción (Madabhushi y col., 2015). Además, en este mismo estudio se pone de manifiesto que las actividades de las enzimas TDP y de los componentes de la vía de reparación NHEJ contribuyen también a la activación de los genes tempranos (Madabhushi y col., 2015; Sharma y col., 2015).

Una maquinaria de reparación activa del ADN podría ser fundamental para la función neuronal durante el desarrollo y en el adulto (Ren y Peña de Ortiz, 2002; Paquola y col., 2017). En las neuronas, al igual que en otros tipos celulares, van a existir diferentes vías de reparación atendiendo al estadio celular en el que se encuentren (McKinnon, 2013). El desarrollo neuronal abarca la proliferación, migración y diferenciación celular que conlleva la generación de neuronas y células gliales en el adulto (**Fig. 11**).

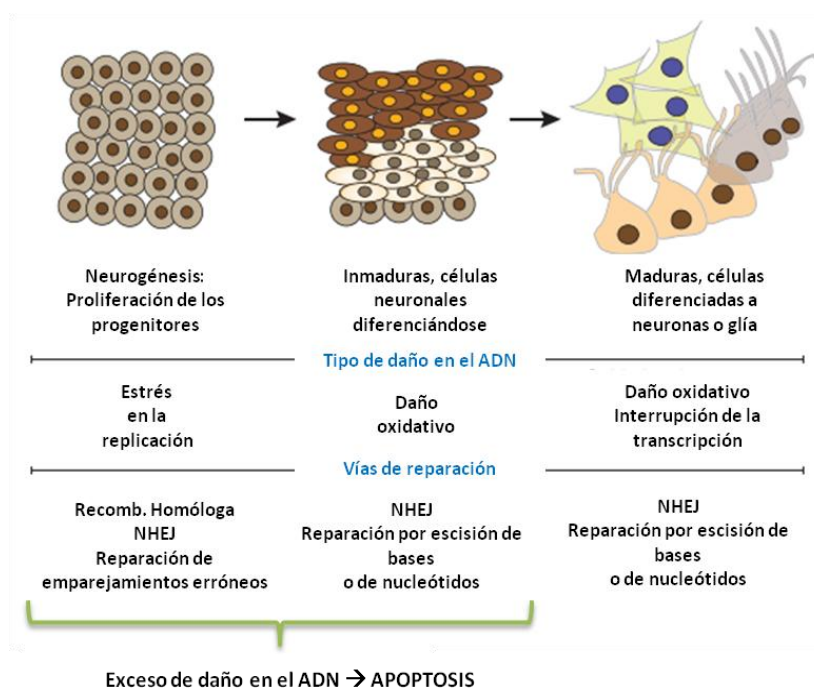


Figura 11. Vías de reparación del ADN durante el desarrollo neuronal. El desarrollo neuronal conlleva proliferación, migración y diferenciación celular que genera neuronas o células gliales en el adulto. En estos procesos se generan roturas en el ADN asociadas a la replicación y/o a la transcripción. Los mecanismos de reparación de estas lesiones son la RH, NHEJ, por emparejamientos erróneos y por escisión de bases o nucleótidos. En células inmaduras, un exceso de daño conlleva a la apoptosis. Modificado de McKinnon, 2013.

Estos eventos dependen de la replicación y transcripción del ADN, lo que puede originar la aparición de roturas en el ADN que han de ser reparadas. Una acumulación de lesiones en el ADN en los estadios iniciales del desarrollo desencadena procesos apoptóticos, mientras que en las neuronas maduras las lesiones no activan las cascadas apoptóticas pero sí pueden interferir con la transcripción génica (McKinnon, 2013).

Defectos en las vías de reparación del ADN en el sistema nervioso pueden tener un efecto perjudicial en la función neuronal (McKinnon, 2009). Así, fallos en los componentes de las vías de reparación NHEJ producen defectos en el desarrollo neuronal (O’Driscoll y col., 2007; Woodbine y col., 2013). De forma similar, la recombinación homóloga, la reparación por escisión de nucleótidos y la reparación acoplada a la transcripción, han sido ampliamente relacionadas con problemas en el desarrollo y trastornos neurodegenerativos (Anttinen y col., 2008; Caldecott, 2008; Shen y col., 2010; Borgesi y col., 2011).

Otro mecanismo que genera roturas en el ADN y que ha sido sugerido como posible mecanismo de generación de la variabilidad genética neuronal, es la recombinación somática. Uno de los primeros trabajos que relacionó la recombinación somática con la generación de la

diversidad neuronal, mostró que la proteína RAG1 se encontraba expresada en las neuronas de hipocampo, cerebelo y corteza piriforme en ratones (Chun y col., 1991). La recombinación V (D) J necesita los componentes de la maquinaria de la vía de reparación NHEJ (Jeggo y col., 1995; Schwarz y Bartram, 1996). Estos componentes también se encuentran expresados en el cerebro de mamíferos en desarrollo y en el organismo adulto (Gao y col., 1998; Gu y col., 2000), sugiriendo que las roturas y reparaciones en el ADN neuronal podrían estar reguladas y ser necesarias para la función neuronal. Además, posteriormente se describió que ciertos genes relacionados con la recombinación de las inmunoglobulinas, también se encontraban expresados en las neuronas de las regiones del cerebro involucradas en el almacenamiento de la información (Peña de Ortiz y Arshavsky, 2001). El bloqueo farmacológico y genético de la actividad de las proteínas de recombinación provoca alteraciones en la consolidación de la memoria en el paradigma de condicionamiento por miedo al contexto (Colón-Cesario y col., 2006; Castro-Pérez y col., 2016). Estos estudios sugieren que, más allá de la generación de la diversidad neuronal, la recombinación somática podría ser necesaria para el almacenamiento de la memoria.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En los últimos años, se ha postulado la idea de que el cerebro es un mosaico genético que resulta de las alteraciones en el genoma individual de cada neurona de un organismo. La generación de este mosaico es un proceso normal en el funcionamiento del cerebro en individuos sanos, pero se desconoce qué papel fisiológico ejerce en estos.

En base a esto, el objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido estudiar el papel de las alteraciones genómicas en los procesos dependientes de activación neuronal.

Para responder a este objetivo general, se establecieron cinco objetivos específicos:

- 1.- Determinar si la retrotransposición de L1 ocurre en el cerebro adulto tras actividad neuronal.
- 2.- Estudiar el papel de la retrotransposición de L1 en los procesos cognitivos.
- 3.- Investigar el curso temporal de la aparición de roturas en el ADN y la inducción de la maquinaria de reparación tras estimulación neuronal en hipocampo y corteza prefrontal.
- 4.- Establecer el papel de algunas proteínas implicadas en el metabolismo del ADN en los procesos de aprendizaje y memoria.
- 5.- Conocer el papel de la proteína H2AX, implicada en la señalización de las roturas del ADN, en la función del sistema nervioso.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

1. SUJETOS EXPERIMENTALES.

Ratones machos de la cepa Swiss de entre 5-6 semanas de edad fueron adquiridos en un distribuidor oficial (Centro de Producción Animal de la Universidad de Sevilla). Por otro lado, la línea de ratones mutantes carentes de la proteína H2AX (H2AX ko, del inglés “knockout”, o H2AX^{-/-}) en la cepa C57/Black6, fueron cedidos amablemente por el Dr. Felipe Cortés Ledesma (Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, CABIMER, Sevilla). Los experimentos con los ratones H2AX ko fueron realizados cuando los hermanos de camada silvestres y mutantes carentes de H2AX, obtenidos por cruce de ratones H2AX heterocigotos para la mutación (H2AX^{+/-}), presentaban 3 meses de edad. Todas las pruebas fueron realizadas de acuerdo a la Legislación de la Unión Europea (2010/63/EU) y española (BOE 34/11370-421, 2013) vigentes en materia de obtención, transporte, cría, cuidado y manipulación de animales de experimentación y con la aprobación del comité ético de la Universidad Pablo de Olavide. Los animales permanecieron en jaulas conjuntas (en grupos de 4-5 animales por jaula) con agua y comida *ad libitum* durante todo el tiempo de estabulación. Las jaulas se ubicaron en estanterías en una habitación cuyos parámetros físicos (12h de luz/oscuridad, temperatura, ventilación y humedad) permanecieron controlados en todo momento.

2. FARMACOLOGÍA E INACTIVACIÓN SELECTIVA DEL HIPOCAMPO.

2.1. Administración sistémica de fármacos.

Para inactivar transitoriamente los eventos de retrotransposición se realizaron administraciones intraperitoneales (i.p.) tras la exposición al ambiente enriquecido, de los siguientes fármacos:

- **Aciclovir** (2-amino-9-(2-hidroxi-etoximetil)-1H-purin-6-ona, *Sigma-Aldrich*). Este compuesto es un análogo de purinas que se activa tras su tri-fosforilación (trifosfato acicloguanosina) es capaz de bloquear la correcta replicación del ADN (Feduchi y col., 2010). Este fármaco fue disuelto en DMSO (dimetil sulfóxido, *Sigma-Aldrich*) y administrado a una dosis de 100 mg/Kg de peso corporal.
- **Lamivudina** (3TC// 2',3'-Dideoxi-3'-tiocitidina, *Sigma-Aldrich*). Es un nucleósido análogo de la citidina que actúa como potente inhibidor de la transcriptasa reversa. Este fármaco fue disuelto en agua y administrado a una dosis de 10 mg/Kg de peso corporal.
- **CPP** (3-(2-Carboxiperazin-4-il) propil-1-ácido fosfónico, *Sigma-Aldrich*) y **NBQX** (1, 2, 3, 4-Tetrahidro-6-nitro-2,5-dioxo-benzo (f) quinoxalina-7-hidrato sulfonamida, *Sigma-Aldrich*). Administradas conjuntamente, actúan como un inhibidor selectivo de las sinapsis glutamatérgicas, concretamente de los receptores de NMDA (CPP) y AMPA (NBQX). Esta mezcla fue administrada a una dosis 5mg (CPP) y 1mg (NBQX) por cada Kg de peso corporal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2. Inhibición transitoria y selectiva de la expresión génica con oligonucleótidos antisentido.

Para bloquear la expresión génica de los genes estudiados, se administró en el hipocampo de ratones de la cepa Swiss 0,5µl de oligonucleótidos antisentidos (OASs, *Integrated DNA Technologies, IDT*) a una concentración final de 2 nmol/µl, disueltos en tampón fosfato (PBS: PB 2x 0,05% [160mM Na₂HPO₄ dodecahidratado (*Sigma-Aldrich*) y 40mM NaH₂PO₄ dihidratado (*Sigma-Aldrich*)], NaCl (Nzytech) 0,15M) a pH 7,4 [Modificado de Taubenfeld, 2001]).

Para el diseño de estos OASs, se realizó la búsqueda de la secuencia del ARNm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) de cada uno de los genes de estudio (Tabla 1). Posteriormente, determinamos en qué posición se encontraba el codón ATG de inicio de la transcripción. Para el diseño del OAS, el ATG de inicio ha de aparecer como tercer codón de la secuencia en sentido 5'→3'. Además, el OAS ha de estar modificado mediante la adición de un grupo tiofosfato en las tres bases terminales de los extremos 5' y 3'. Como control del efecto de los OAS se diseñó uno con secuencia aleatoria o "random" conteniendo el mismo porcentaje de bases que los OASs específicos. Cada una de las secuencias fue confirmada mediante el uso de un algoritmo de búsqueda de homologías en una base de datos (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

GEN	SECUENCIA
<i>tdp1</i>	G*C*T*TTCTTGGGACATTATA*C*T*
<i>tdp2</i>	G*C*T*GCCAGACGCCATCGCC*G*C*
<i>h2ax</i>	G*C*C*GCGTCCGGACATAGTG*T*A*
<i>orf1</i>	T*T*T*GCCTTCGCCATCTGG*T*A*
<i>orf2</i>	T*G*T*TAGAGTTGGCATTCTG*T*T*

Tabla 1. Secuencias en sentido 5'→ 3' de los 21 nucleótidos específicos de cada OAS utilizado. En negrita y con el asterisco (*) se muestran los oligonucleótidos protegidos en cada OAS. En cursiva y subrayado se localiza el codón de iniciación del gen en cuestión.

2.3. Implantación de cánulas.

Los ratones fueron anestesiados mediante administración intraperitoneal de hidrato de cloral (4% en solución salina, *Sigma-Aldrich*) a una dosis de 10µl de anestésico por gramo de peso corporal del animal. Una vez el ratón se encontraba anestesiado completamente, sin presentar reacción refleja a la opresión de la cola y en la palma de las patas traseras, fue fijado en el aparato estereotáxico. Se realizó una incisión en la piel para exponer el cráneo y una vez comprobadas las coordenadas de bregma y λ, se implantaron bilateralmente una pareja de cánulas de acero inoxidable (grosor de 21G y 10mm de longitud) en el hipocampo rostral, siguiendo las siguientes coordenadas estereotáxicas:

Antero-Posterior (AP)= -2,2mm; Lateral (L)= ±1,5mm; y Profundidad (P)= -0,8mm.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Las coordenadas AP y L fueron establecidas con respecto a la coordenada obtenida para Bregma, mientras que la coordenada P fue determinada con respecto a la superficie del cerebro. Las cánulas se fijaron al cráneo a través de un tornillo sobre una base de cianocrilato y cemento dental (*Duralay, Dental Mfg.Co.*). Para evitar la obstrucción de las cánulas y aumentar así la eficiencia de la cirugía, se les colocó un alambre de acero inoxidable en su interior.



Figura 1. Cirugía estereotáxica. Imágenes representativas de la cirugía para implantar una pareja de cánulas en las coordenadas correspondientes al hipocampo rostral del ratón.

2.4. Administración de los oligonucleótidos antisentidos.

Los OASs fueron administrados dos semanas después de finalizada la cirugía, para asegurar la recuperación total del animal. La administración intrahipocampal se realizó 30 min antes de las sesiones de entrenamiento. Para llevar a cabo las administraciones se usó una jeringa de microinyección (*Hamilton*) de 1 μ l de volumen total que fue introducida a una profundidad de 10mm en cada una de las cánulas. La velocidad de administración fue de 0,2 μ l/min. Para evitar el reflujo del producto inyectado y ayudar así a la correcta difusión del mismo, dejamos la microjeringa introducida en la cánula durante 1 min.

3. PRUEBAS CONDUCTUALES.

Como consideración previa, todos los dispositivos así como los objetos utilizados durante las pruebas, fueron limpiados cuidadosamente con etanol (70% en agua, *Applichem*) previo a la realización de los experimentos, además de entre sesiones y animales para evitar la interferencia de olores que pudieran alterar los patrones conductuales de los ratones.

3.1. Conducta Motora: actividad en campo abierto, fuerza muscular y coordinación y aprendizaje motor.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Actividad en campo abierto: Actímetro.

El ratón fue introducido en un campo abierto rectangular (38x15x25cm) acoplado a un actímetro (*Cibertec Actifot 8*) durante 15 min. El actímetro consiste en una caja rectangular que es atravesada por varios haces-sensores infrarrojos. Estos sensores se encuentran acoplados a un ordenador que registra el número de veces que el ratón interrumpe los haces infrarrojos por minuto. Tras 24 h se repitió el paradigma pero esta vez, el tiempo de exploración fue de 5 min. Con este protocolo realizado en dos días podemos estudiar la capacidad de habituación de los ratones a entornos novedosos tanto a corto como a largo plazo. Los datos fueron representados como actividad, número de roturas de haces infrarrojos, por minuto para cada una de las sesiones.

3.1.2. Fuerza muscular: Tensiómetro.

Para caracterizar la función muscular, realizamos una medida de fuerza muscular mediante el uso de un tensiómetro (*Digital Force Gauges, Chatillon DFE AMETEK*). Este aparato consiste en una rejilla metálica acoplada a un sensor capaz de calcular la fuerza máxima de agarre a la rejilla. Este test se realizó 3 veces consecutivas por animal y los datos fueron representados como el promedio de estas tres medidas en relación al peso de cada ratón.

3.1.3. Coordinación y aprendizaje motor: Rotarod.

El rotarod (*Ugo Basile Biological Research Apparatus*) consiste en un cilindro giratorio horizontal (3cm de diámetro y 30cm de longitud) de superficie rugosa y velocidad de giro controlada. Este cilindro, presenta unos círculos perpendiculares (6cm de diámetro) que lo dividen en 5 calles de ejercicio. Previo a las sesiones de entrenamiento, se realizó una sesión de habituación que consistió en colocar a los ratones sobre el cilindro durante 1 min a velocidad constante de 20rpm. El entrenamiento consistió en 4 sesiones de 5 min en un solo día durante las cuales la velocidad de giro del rodillo fue aumentando hasta alcanzar 60rpm. 24 h después del entrenamiento, se evaluó la memoria motora realizando una única sesión de 5 min similar a una de las sesiones de entrenamiento. Todas las sesiones fueron grabadas para la posterior cuantificación del número de caídas por sesión.

3.2. Comportamiento Sensitivo: nocicepción y respuesta a estímulos acústicos de diferente intensidad.

3.2.1. Nocicepción: Placa caliente.

Los ratones fueron colocados en una superficie caliente (4x4cm) delimitada por un cubo con paredes de plástico transparente (4x4x16cm) para evitar el escape del ratón. Se evaluó el tiempo de retracción de al menos una de las cuatro patas a tres temperaturas diferentes: 47,5°C- 50°C- 52,5°C. La medida se realizó por duplicado en cada temperatura y se estableció

3. MATERIALES Y MÉTODOS

30 s como tiempo máximo de realización de la retracción para evitar que el ratón sufriera daños.

3.2.2. Respuesta a estímulos acústicos de diferente intensidad: Prueba de sobresalto acústico.

El test de sobresalto acústico es una medida de la integración sensoriomotora de los animales. Se evalúa mediante el uso de un aparato denominado Startled (*Cibertec S.A.*). Este dispositivo consiste en una cámara oscura que presenta un cilindro donde se introduce el animal, acoplado a un sensor capaz de cuantificar la amplitud y la latencia de la respuesta de sobresalto del ratón ante distintas intensidades de sonidos e incluso distintos patrones de estimulación acústica.

Con el fin de evaluar la respuesta de los ratones a estímulos acústicos de distinta intensidad el ratón se expuso a estímulos sonoros con una duración de 100 ms, que se encontraban en un rango de intensidades comprendidas entre 75-120 dB, siguiendo el esquema que aparece en la **tabla 2**.

ORDEN	INTENSIDAD (db)	ORDEN	INTENSIDAD (db)	ORDEN	INTENSIDAD (db)
1	115	21	115	41	95
2	120	22	75	42	120
3	120	23	120	43	105
4	120	24	95	44	95
5	115	25	105	45	120
6	85	26	85	46	105
7	115	27	105	47	115
8	105	28	120	48	120
9	75	29	75	49	105
10	105	30	95	50	75
11	105	31	95	51	85
12	95	32	95	52	115
13	75	33	85	53	120
14	75	34	85	54	115
15	120	35	85	55	75
16	115	36	85	56	115
17	75	37	75	57	85
18	95	38	105	58	115
19	105	39	95	59	75
20	85	40	85	60	95

Tabla 2. Protocolo aplicado para la respuesta acústica a estímulos sonoros de diferente intensidad. Orden de aparición e intensidad de cada uno de ellos. dB: decibelios.

Los parámetros del sobresalto representados fueron la latencia de la respuesta, la latencia del pico y el valor de la amplitud de éste, para cada una de las intensidades.

3.3. Evaluación de los estados de ansiedad.

3.3.1. Laberinto en cruz elevado.

El laberinto en cruz elevado consiste en cuatro brazos de 35cm de largo, 6cm de ancho y que se encuentra a 70cm del suelo. Dos de los brazos opuestos presentan paredes de 21cm de altura siendo una de color negro y otra de color blanco. Los dos brazos restantes no están limitados por paredes, pero presentan el suelo pintado uno de color blanco y el otro de color negro. Para llevar a cabo este paradigma, los animales fueron situados en el centro de la cruz pudiendo moverse libremente por todos los brazos durante 5 min. El análisis de este comportamiento consistió en calcular el tiempo que el ratón permanecía en los brazos abiertos y en los brazos cerrados, así como el número de entradas que realizaban a cada uno de ellos. Como criterio general de análisis se consideró que el ratón estaba dentro del brazo cuando sus cuatro patas lo estuvieran.

3.3.2. Test de emergencia.

Consiste en una pequeña caja (17x16x17cm) cerrada con una apertura de salida, que se encuentra situada en el centro de un campo abierto (55x40x40cm). Los ratones fueron introducidos en la caja al comienzo de la sesión y se les permitió la libre exploración durante 5 min. El parámetro que se evaluó como indicador del estado de ansiedad del animal fue el tiempo total que el ratón permanecía explorando la periferia del campo abierto.

3.3.3. Enterramiento de canicas.

En una arena (20cm de anchura, 36cm de largo y 14 de profundidad) con 2cm de serrín en su base se colocaron 12 canicas, ordenadas en 3 columnas de 4 filas. El ratón fue introducido en la arena y se le permitió la exploración libre durante 10 min. Como medida de ansiedad se cuantificó el número de canicas enterradas, considerándose como tal cuando quedaba menos de un 25% en la superficie.

3.4. Evaluación del grado de depresión.

3.4.1. Test de nado forzado de Porsolt.

El test de nado forzado se realizó en cilindros de cristal (30cm de diámetro y de 30cm de altura) conteniendo agua a 23°C hasta una altura suficiente tal que el ratón no pudiera escapar ni tocar la base del cilindro. En un primer día, los ratones fueron introducidos en estos recipientes durante 15 min y 24 h después se volvieron a introducir durante 5 min. Las sesiones fueron grabadas para su posterior análisis. Los datos obtenidos fueron representados como el tiempo de parálisis (tiempo de flotación) acumulado a lo largo de la sesión del segundo día.

3.4.2. Preferencia de sacarosa.

Los ratones fueron habituados durante dos días a la presencia de dos biberones que contenían agua y los cuales eran cambiados de posición cada 12 h a fin de evitar una posible preferencia de lugar. Tras la habituación, el agua de uno de los dos biberones fue sustituida por una solución de sacarosa al 2% (*Panreac*). Se cuantificó el volumen de sacarosa y de agua ingerido durante 4 días consecutivos, en los cuales la posición de los biberones era alternada aleatoriamente cada 12 h. Los datos obtenidos fueron representados como el porcentaje de preferencia de sacarosa, atendiendo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Preferencia de sacarosa} = [\text{ml sacarosa consumidos} / (\text{ml sacarosa} + \text{ml agua})] * 100$$

3.5. Conducta social.

3.5.1. Test de interacción.

Esta prueba se realizó en un campo abierto dividido en tres compartimentos iguales (21x21x41cm) comunicados por una apertura. Los ratones fueron depositados en el compartimento central pudiendo acceder libremente a los compartimentos laterales. Esta prueba se realizó en cuatro fases en las que el ratón pudo explorar libremente durante 5 min en cuatro situaciones diferentes:

- Primera fase: los compartimentos laterales contenían una jaula (9cm de diámetro y 10,5cm de alto) vacía.

- Segunda fase: en una de las jaulas de los compartimentos laterales se introdujo un ratón hermano de camada que cohabitaba con el ratón experimental (ratón familiar) en la misma caja en el estabulario.

- Tercera fase: el animal familiar fue retirado y se introdujo en la jaula del compartimento lateral opuesto un ratón de otra cepa que no hubiera tenido ningún contacto previo con el ratón experimental (ratón extraño).

- Cuarta fase: se vuelve a introducir el ratón familiar en la jaula lateral vacía permitiendo la interacción del ratón experimental tanto con el ratón familiar como con el extraño, situados en cada uno de los compartimentos laterales.

Todas las sesiones fueron grabadas para realizar el análisis del tiempo que el ratón permaneció en cada uno de los compartimentos, así como el tiempo de interacción directa con cada una de las jaulas en las distintas sesiones. Atendiendo a la sesión, el índice de preferencia de interacción social fue calculado como la sustracción del tiempo de interacción entre: (1)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

jaula vacía del compartimento familiar-jaula vacía del compartimento extraño; (2) ratón familiar-jaula vacía; (3) jaula vacía-ratón extraño; (4) ratón familiar-ratón extraño.

3.5.2. Formación del nido.

En esta prueba se mide la capacidad innata de los ratones de formar un nido como protección del entorno. Para ello, se introdujo en la caja de estabulación una pieza de algodón de aproximadamente 1 g de peso y se realizaron medidas del material de algodón que los ratones no habían utilizado para la formación del nido a 1, 2, 4, 6 y 24 horas después de comenzar la prueba.

3.6. Aprendizaje y memoria: memoria de trabajo, cognición sin componente emocional y cognición con componente emocional.

3.6.1. Memoria de trabajo: Laberinto en Y.

El laberinto en Y consiste en tres brazos idénticos (8cm de ancho, 18cm de largo y 38cm de alto) y que se encuentra a 70cm del suelo. Los ratones fueron situados en el centro del laberinto, permitiendo la libre exploración de cada uno de los tres brazos, durante 8 min. El análisis consistió en la cuantificación del número total de entradas en cada uno de los brazos y de las veces que el ratón entró dos veces consecutivas al mismo brazo lo que se consideró como un error. El porcentaje de errores se calculó atendiendo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Alternancia} = (\text{Número de alternancias} / [\text{Entradas totales} - 2]) * 100$$

3.6.2. Cognición sin componente emocional: Reconocimiento de objetos nuevos.

Esta prueba se fundamenta en la naturaleza innata de los ratones de explorar la novedad frente a lo familiar. Para su realización, los ratones fueron expuestos a un campo abierto rectangular (55x40x40cm) en el que se presentaron dos objetos iguales o diferentes, en función del protocolo a realizar. En primer lugar, se llevó a cabo una sesión de habituación al campo abierto durante 5 min. Posteriormente, realizamos una sesión de entrenamiento donde los ratones se expusieron a dos objetos idénticos durante 15 min. Una o 24 horas después de la sesión de entrenamiento, realizamos un test de 10 min donde el ratón fue expuesto a un objeto familiar (uno de los utilizados anteriormente en el entrenamiento) y a otro novedoso (que difiere en forma y color del familiar, pero que se mantiene en la misma posición) para evaluar la adquisición de la información (memoria a corto plazo, MCP) o el almacenamiento de ésta (la memoria a largo plazo, MLP). Todas las sesiones fueron grabadas para el análisis off-line. El análisis consistió en cuantificar el tiempo de la exploración activa (si el animal se posicionaba hacia el objeto en una distancia de $\pm 1,5$ cm y/o tocándolo con la nariz o las vibrisas) de los objetos en cada una de las sesiones. El aprendizaje o la formación de la

3. MATERIALES Y MÉTODOS

memoria fueron determinados mediante el cálculo del índice de discriminación en cada sesión. Este índice se calcula atendiendo a la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de discriminación entre objetos, ID} = (t_{\text{novedoso}} - t_{\text{familiar}}) / (t_{\text{novedoso}} + t_{\text{familiar}})$$

3.6.3. Cognición con componente emocional: Evitación pasiva.

Esta prueba se basa en la preferencia innata de los ratones por ambientes oscuros y cerrados. Por lo tanto, el animal deberá aprender a frenar su comportamiento innato para evitar así, recibir un estímulo aversivo.

El paradigma fue llevado a cabo en un aparato de evitación pasiva (*Ugo Basile Biological Research Apparatus*) el cual consiste en una caja (47x18x26cm) que se encuentra dividida en dos compartimentos iguales (28,5x 28,5cm) siendo uno de ellos claro y con luz, y otro oscuro. Ambos se encuentran comunicados por una puerta. En primer lugar, se realizó una sesión de habituación de 1 min, durante el cual el ratón pudo explorar libremente ambos compartimentos. Posteriormente se realizó la sesión de entrenamiento, donde el ratón se introdujo en el compartimento claro durante 30 s. Pasado este tiempo, se abrió la puerta que separaba los compartimentos y se encendió la luz. Una vez el ratón pasó al compartimento negro, se cerró la puerta y recibió un estímulo eléctrico a través de la rejilla del suelo del aparato. La intensidad del estímulo dependió de la cepa del ratón; los ratones de la cepa Swiss recibieron un estímulo de 0,5mA durante 5 s, mientras que para los ratones de la cepa C57/Black6, el estímulo fue de 0,3mA durante el mismo tiempo. En la sesión de entrenamiento se registró la latencia de entrada al compartimento negro (segundos). Para evaluar la adquisición de la información, realizamos el mismo test 1 h después de la sesión de entrenamiento (memoria a corto plazo, MCP) pero cambiando el estímulo eléctrico a 0,2mA durante 5 s. De nuevo, se registró la latencia de entrada al compartimento oscuro. Posteriormente, fue evaluada la retención de la memoria exponiendo al animal a la misma experiencia a las 72 h tras el entrenamiento (memoria a largo plazo, MLP). Los resultados obtenidos se representaron como el número de veces la latencia de entrada en el entrenamiento para la MCP y la MLP.

Todos los ensayos conductuales fueron realizados por el experimentador sin conocer el tratamiento farmacológico, el genotipo o la manipulación que había recibido cada ratón.

4. SACRIFICIO Y EXTRACCIÓN DEL TEJIDO.

Los ratones fueron anestesiados con hidrato de cloral al 4% (i.p.) a una dosis de 10µl por gramo de ratón y perfundidos intracardiamente con solución salina (NaCl, *Nzytech*) al 0,9%. A continuación, el ratón fue decapitado y se extrajo el cerebro. Un hemisferio fue reservado para histología fijándolo con una solución de paraformaldehído (*Panreac*) al 4% en solución salina durante 48 h a 4°C y crioprotegido en una solución de sacarosa (*Panreac*) al 30% en

solución salina, hasta alcanzar el equilibrio (48-72 h) a 4°C. Por otro lado, del otro hemisferio se microdisecionó el hipocampo y la corteza prefrontal, conservándolos a -80°C para su futuro procesamiento.

5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

5.1. Exposición a un ambiente enriquecido como protocolo de activación neuronal para el estudio de la expresión génica.

Los ratones se introdujeron de forma individual en cajas rectangulares (55x40x40cm) localizadas en una habitación con iluminación tenue y con ruido de fondo constante. Las cajas contenían serrín nuevo (cubriendo el fondo) y varios objetos, consistentes en piezas de plástico de diferentes formas, tamaños, texturas y colores. Al ratón se le permitió la libre exploración en este entorno enriquecido durante 15min. Una vez finalizada la exposición al ambiente rico, los ratones fueron devueltos a su jaula de estabulación y se sacrificaron a los 30 min, 1, 3, 6 y 24 horas tras haber finalizado la sesión de exploración.

5.2. Extracción de ARN.

A partir de los tejidos conservados a -80°C, obtuvimos los extractos de ARN total según el siguiente protocolo:

Previo a la extracción, los tubos de homogeneización fueron lavados con una solución de NaOH (*Applichem*) a una concentración de 0,1M durante 20 min. Posteriormente el exceso de NaOH fue lavado abundantemente con agua destilada estéril antes de introducir los tejidos.

- Se añadió 1ml del reactivo de extracción (Total RNA Extraction Kit Easy-Blue™, *Intron Biotechnology*) y 1µl de glicógeno (20 mg/ml, *Thermo Scientific*) por cada 50-100mg de tejido.
- La homogeneización del tejido se llevó a cabo en el homogeneizador Gentle MACS Dissociator (*Miltenyi Biotec*), seleccionando el programa específico de extracción de tejido congelado.
- El homogenado fue centrifugado a 4°C durante 1 min a 4.000g y se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5ml estéril.
- Se añadieron 200µl de triclorometano (*Panreac*) por cada ml de reactivo de extracción añadido al inicio y se mezcló en un agitador tipo vórtex durante 15 s.
- Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugamos a 4°C durante 15 min a 12.000rpm.
- Recuperamos el sobrenadante y los transferimos a un tubo eppendorf estéril nuevo, donde añadimos 500µl de 2-propanol (*Applichem*) por cada ml de reactivo de

3. MATERIALES Y MÉTODOS

extracción y mezclamos por inversión. El resto del homogenado fue congelado a -20°C para su posterior utilización en la extracción de ADN.

- Incubamos a temperatura ambiente durante 10 min y centrifugamos a 4°C durante 10 min a 12.000rpm.
- Descartamos el sobrenadante y nos quedamos con el precipitado al cual añadimos 1ml de etanol (*Applichem*) al 75% en agua bidestilada estéril.
- Centrifugamos a 4°C durante 5 min a 12.000rpm.
- Descartamos el sobrenadante y dejamos secar el precipitado bajo la luz de una lámpara.
- El precipitado obtenido de ARN fue resuspendido en 20-40 μl de agua bidestilada estéril mediante pipeteo y conservado a -20°C .

5.3. Extracción de ADN.

A partir de la fase orgánica descartada en la extracción de ARN, y que guardamos a -20°C , realizamos la extracción de ADN siguiendo el siguiente protocolo:

- Añadimos 300 μl de etanol al 100% por ml de reactivo de extracción utilizado en la extracción de ARN y mezclamos varias veces por inversión.
- Incubamos a temperatura ambiente durante 3 min y posteriormente, centrifugamos a 4°C durante 5 min y a 10.000rpm.
- Descartamos el sobrenadante y añadimos 1ml de citrato sódico 0,1M (*Serva GmbH*) diluido en etanol al 10%.
- Incubamos durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente centrifugamos a 4°C durante 5 min a 10.000rpm.
- Descartamos el sobrenadante y repetimos los pasos dos pasos anteriores, dos veces más.
- Añadimos 1,5ml de etanol al 75% e incubamos durante 15 min a temperatura ambiente.
- El homogenado se centrifugó a 4°C durante 5 min a 10.000rpm y nuevamente descartamos el sobrenadante quedándonos con el precipitado.
- El precipitado se dejó secar bajo una lámpara y fue resuspendido en 100 μl de agua bidestilada estéril mediante pipeteo. Posteriormente, fue conservado a -20°C hasta su utilización.

5.4. Cuantificación del ARN y del ADN obtenido.

Para cuantificar el ARN y el ADN obtenido en las correspondientes extracciones, se midió la absorbancia de nuestras muestras en un espectrofotómetro (MaestroNano[®] Spectrophotometer, *MaestroGen Inc.*). Tras realizar el blanco con agua destilada estéril, se

3. MATERIALES Y MÉTODOS

colocó 1µl de cada una de las muestras y se procedió a la cuantificación de su concentración (ng/µl) en base al valor de absorbancia a 260nm.

5.5. Retrotranscripción del ARN.

A partir del ARN total obtenido, se llevó a cabo la retrotranscripción para obtener ADN complementario (ADNc). Para ello utilizamos un kit comercial liofilizado de retrotranscripción (RevoScript Reverse Transcriptase PreMix Random Primer, *iNtRON Biotechnology, INC.*) el cual incluye dNTPs, oligonucleótidos hexaméricos con secuencia aleatoria, inhibidores de ARNasas, un buffer de reacción, estabilizadores y la retrotranscriptasa. En cada reacción de retrotranscripción se añadió 1µg de ARN y completamos con agua estéril hasta 20µl. La reacción tuvo lugar en un termobloque (*BIOER*) programado según las condiciones recomendadas por el fabricante del kit de retrotransposición:

- 60min a 50°C para que se produzca la síntesis del ADNc.
- 5 min a 95°C para la inactivación de la retrotranscriptasa.

El ADNc obtenido fue conservado a -20°C hasta su utilización.

5.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativa.

Se prepararon reacciones independientes por cada muestra de ADNc o de ADN genómico (ADNg). En función del gen que amplificamos, debido a sus niveles de expresión, utilizamos distintas Taq polimerasas:

1.- Para la amplificación de los genes β -actina (usado como gen constitutivo del ADNc), 53bp1, ADN ligasa IV, ADN-PKcs, h2ax, rad51, rad52, tdp1, tdp2, xrcc5 y xrcc6, se utilizó la premix Taq Green 2x (*Thermo Scientific*) en un volumen final de 25µl. Para ello se mezcló: 12,5µl de premix Taq polimerasa, 0,4µl de cada pareja de cebadores (25mM, *IDT Integrated DNA Technologies*), 1µl de ADNc y agua destilada estéril hasta 25µl.

2.- Para la amplificación de LPLg (gen normalizador del ADNg), orf1 y orf2 se utilizó la polimerasa DREAM Taq (*Thermo Scientific*). Para cada reacción se añadió: 0,2µl de Taq polimerasa, 2µl de Buffer (DREAM Taq Green 10x, *Thermo Scientific*), 0,4µl de dNTPs (10mM, *Thermo Scientific*), 0,32µl de cada pareja de cebadores, 1µl de ADNc o ADNg y completamos hasta 20µl con agua destilada estéril.

La secuencia de los cebadores empleados, el tamaño del producto de amplificación y la temperatura de hibridación de cada pareja de cebadores se muestra en la **tabla 4**.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

GEN	CEBADOR SENTIDO ("FORWARD")	CEBADOR ANTISENTIDO ("REVERSE")	TAMAÑO (pb)	HIBRIDACIÓN
<i>β-actina</i>	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAA	ATAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	263	60°C
<i>rad51</i>	GAGCTGCTGGCACAAGTCTA	GATCATTGTTGGGCGAGGC	159	62°C
<i>rad52</i>	CGAAGAGGTGGCAGCCAAG	AAGTTTGGGCTGGTTCTGCT	200	62°C
<i>xrcc5</i>	CACCTCAAACCTCCTTCCC	TTGCGTCCACAACCTACCCAA	286	62°C
<i>xrcc6</i>	GGAGTCGGAGCAAGTGGTAG	AGTGAGCTTACCCAGTGTGC	238	62°C
<i>ADN PKcs</i>	TCGGGCTGCCAGAAGGGATT	CGCATCCCACGCCACGTACT	204	60°C
<i>tdp1</i>	CCAAGGGCAGACGATGAGT	CACAAGCAGGATCGGGTTCT	268	62°C
<i>tdp2</i>	CCTGAGCGCCTACTTCGAG	CTCTCGGGCAGATTGCATCC	222	62°C
<i>h2ax</i>	CGTGGTCTCTCAGCGTTGT	CTACAGGGAAGTGAAGGCCG	129	62°C
<i>53bp1</i>	CAGCGTGCTATCTCGACAC	AAGCAGCTTCTACTGTCACTGC	263	62°C
<i>LPLg</i>	ATCCAAGGGTAGCAGACAGGT	GGATGGACGGTAAGAGTGATT	216	56°C
<i>orf1</i>	AGGCTACTATACCCGGCCAAA	CTTTCTGGTTGTTCTAGGGC	171	56°C
<i>orf2 (LINE-1)</i>	CCATGCTCATGGATTCC	ATTCTATTCCATTGGTCTA	290	56°C

Tabla 4. Secuencia de los cebadores empleados en el análisis de la expresión génica por PCR semicuantitativa.

Una vez preparadas las mezclas de reacción, las muestras fueron colocadas en un termociclador (*Biometra*) programado con las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 5min.
- N número de ciclos de amplificación:
 - 20 s a 95°C.
 - 30 s a la temperatura específica de cada pareja de cebadores.
 - 30 s a 72°C.
- Extensión final a 72°C durante 5 min.
- Mantenimiento del producto de PCR a 4°C.

En el caso de los cebadores utilizados para amplificar la expresión de los genes de retrotransposición (*LPLg*, *orf1*, *orf2*), las condiciones que se programaron en el termociclador, fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min.
- N número de ciclos de amplificación:
 - 30 s a 95°C.
 - 30 s a 56°C.
 - 1 min a 72°C.
- Extensión final a 72°C durante 3 min.
- Mantenimiento del producto de PCR a 4°C.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En todos los casos, se fueron extrayendo alícuotas del producto de amplificación desde los 20 ciclos hasta los 40, con un espaciamento de 5 ciclos, para cuantificar el producto de PCR cuando la reacción aún no está saturada.

5.7. Electroforesis de ADN.

Para visualizar el producto de PCR amplificado se realizaron electroforesis en geles de agarosa (*Nzytech*), siguiendo el siguiente protocolo:

- Se preparó un gel de agarosa al 2% en tampón TBE (89mM Tris-Base, *iNtRON Biotechnology*; 89mM ácido bórico, *Panreac*; 1mM EDTA pH 8, *Appllichem*) con bromuro de etidio (*Serva GmbH*) a una concentración final de 0,5mM.
- Una vez polimerizado el gel, éste fue colocado en una cubeta de electroforesis con los pocillos orientados hacia el polo negativo.
- Se añadió solución tamponada TBE en la cubeta de electroforesis hasta cubrir por completo el gel.
- Se cargaron las muestras en cada uno de los pocillos del gel así como el marcador de tamaño FastRuler Low Range DNA Ladder (*Thermo Scientific*).
- Se conectó la cubeta a una fuente eléctrica (*Electrophoresis Power Supplies Consort EV243*) y la migración de las muestras fue llevada a cabo a voltaje constante (90V durante 25min).

Una vez finalizada la electroforesis, las bandas obtenidas fueron visualizadas en un transiluminador ultravioleta (*Major Science UVDI*) provocando la excitación y la emisión de fluorescencia del bromuro de etidio intercalado en las muestras (la fluorescencia emitida será proporcional a la cantidad de ADN existente). El transiluminador se encontraba acoplado a una cámara (*Canon*) permitiéndonos obtener una imagen del gel para su posterior análisis.

5.8. Cuantificación del ADN obtenido.

Para cuantificar el ADN se utilizó el programa de análisis ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) que permite la cuantificación por densitometría óptica. Para ello, tomamos el valor de densidad óptica de cada banda y se le sustrajo el valor obtenido para el fondo de la imagen. Estos valores fueron relativizados frente β -actina (gen cuya expresión es constitutiva) o LPLg para las inserciones de LINE-1.

5.9. Obtención de muestras y genotipado de los ratones silvestres y mutantes nulos para el gen h2ax.

Los ratones obtenidos mediante cruces de parentales de genotipo heterocigoto (+/-) para el gen h2ax mutado, fueron marcados mediante biopsia digital a la edad de 7-10 días postnatal,

3. MATERIALES Y MÉTODOS

siguiendo un código determinado. Con este método conseguimos material para genotipar además de tener un control de la colonia.

Para la extracción del ADN de los tejidos realizamos el siguiente protocolo:

- Centrifugamos las muestras a 13.000rpm durante 1 min.
- Añadimos 50µl de una solución de lisis alcalina de NaOH-EDTA a una concentración de 25mM y 0,2mM, respectivamente (*Applichem*).
- Las muestras fueron incubadas durante 30 min en un baño con agitación a 65°C. Posteriormente, la temperatura se aumentó hasta alcanzar los 95°C y dejamos incubar durante 15 min.
- Dejamos enfriar en hielo durante 1 min.
- Se añadieron 50µl de TrisHCl (*Applichem*) a una concentración de 40mM.
- Las muestras fueron centrifugadas durante 1 min a 13.000rpm y posteriormente se transfirieron 50µl del sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
- El ADN se conservó a -20°C hasta su utilización.

Una vez obtenido el ADN, el genotipado se hizo por PCR. Para la amplificación realizamos dos reacciones paralelas donde manteniendo el mismo cebador sentido (“forward”) y cambiando la posición del cebador antisentido (“reverse”), podemos obtener dos productos de amplificación de tamaños diferentes para el alelo silvestre (547pb) y el alelo mutante (424pb). En cuanto a la reacción de amplificación, se utilizó la premix Taq Green 2x (*Thermo Scientific*) mezclando las siguientes cantidades: 10µl de Taq polimerasa, 0,16µl de cada uno de los cebadores (25mM; **tabla 5**), 1µl del ADN extraído y completamos hasta 20µl con agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min.
- 30 ciclos de amplificación:
 - 30 s a 95°C.
 - 30 s a 60°C.
 - 30 s a 72°C.
- Extensión final a 72°C durante 5 min.
- Mantenimiento del producto de PCR a 4°C.

CEBADOR SENTIDO ("FORWARD")	CEBADOR ANTI SENTIDO 1 ("REVERSE 1")	CEBADOR ANTI SENTIDO 2 ("REVERSE 2")
CTCTTCTACCTCGTACACCATG TCCG	CGAAGTGGCTCAGCTCTTTCTGTG AGGG	GTCACGTCCTGCACGACGC GAGC

Tabla 5. Secuencias de los cebadores para el genotipado de los ratones nulos para el gen h2ax.

Para visualizar el tamaño de los productos amplificados se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2%, y se visualizó como se explicó anteriormente.

6. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.

Los cerebros crioprottegidos fueron cortados en secciones coronales de 50µm de grosor en un micrótomo de congelación Leica SM 2000R (*Leica Microsystems*) en 6 series en las que los cortes sucesivos de cada serie estuvieron espaciados 300µm. Las secciones se almacenaron a -20°C en placas de 24 pocillos, las cuales contenían una solución anticongelante: glicerina (30%, *Sigma-Aldrich*), etilenglicol (30%, *Panreac*), tampón fosfato (PB) 40% (80mM Na₂HPO₄-12H₂O (*Applichem*), 20mM NaH₂PO₄ - 2H₂O (*Panreac*).

6.1. Tinción de Nissl.

La tinción de Nissl se utilizó para visualizar la morfología macroscópica tanto en los cerebros de los ratones h2ax KO, como para comprobar la situación de las cánulas en los ensayos de administración intrahipocampal de los OASs. Para ello se utiliza un colorante básico (azul de toluidina) que reacciona con los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos en un medio ácido. La metodología a seguir fue la siguiente:

- Se realizaron varios lavados con PBS para eliminar el anticongelante de los tejidos.
- Se montaron los cortes histológicos en portaobjetos gelatinizados con solución de montaje: 0,5% gelatina (*Panreac*), en etanol al 25% (*Applichem*) y se dejaron secar 48 horas.
- Los portaobjetos con los cortes se sumergieron en azul de toluidina al 0,1% (*Sigma-Aldrich*) en tampón acético-acetato (*Panreac*) a pH 3-4, durante 1 min.
- Se lavaron dos veces en agua destilada durante 1 min para eliminar el exceso de colorante.
- Se deshidrataron introduciendo los portas sucesivamente en:
 - Alcohol 70% durante 1 min.
 - Alcohol 90% durante 1 min.
 - Alcohol 100% durante 1 min
 - Xilol (*Panreac*), 2 veces durante 1 min.
- Los cortes fueron cubiertos con DPX (*Panreac*) y cubreobjetos.
- Se dejaron secar al menos durante 96 h, y las preparaciones se limpiaron retirando el exceso de DPX con una cuchilla y alcohol al 70%.

Las preparaciones fueron conservadas a temperatura ambiente hasta su posterior visualización en el microscopio.

6.2. Inmunohistoquímica.

Esta técnica, que se basa en la especificidad antígeno-anticuerpo, fue llevada a cabo para la realización de estudios precisos de morfología, localización y expresión de antígenos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

específicos. Para ello, realizamos el protocolo descrito a continuación para cortes flotantes en agitación (modificado de Martínez y Belmonte, 1996):

- Realizamos 3 lavados de 4 min cada uno con PBS para eliminar el exceso de anticongelante.
- Se permeabilizó el tejido mediante 3 lavados de 8 min en PBS más 0,5% de Tritón-X-100 (*Applichem*) (PBS-T 0,5%).
- Se realizaron 2 lavados de 8 min cada uno, con PBS para eliminar el exceso de detergente.
- Los cortes fueron incubados en una solución de inactivación de la peroxidasa endógena del tejido (25% agua destilada, 25% en PB2x, 50% etanol, 1,66% en agua oxigenada y agua destilada hasta llegar al 100% del volumen a preparar) durante 20 min.
- Se realizaron 2 lavados de 10 min con PBS.
- Se equilibraron los tejidos con 2 lavados de 10 min en PBS-T 0,5%.
- Los cortes fueron incubados durante 1 h con una solución de bloqueo de antígenos tisulares (gelatina al 10% y suero fetal bovino, *PAA Laboratorios GmbH*, al 10% en PBS-T 0,5%) para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo primario.
- Se incubó con el anticuerpo primario específico para Calbindina (hecho en ratón, *Santa Cruz Biotechnology*) a una dilución final de 1:1500, en una solución de gelatina al 10% y suero fetal bovino al 3% en PBS-T 0,5% durante 1 h a temperatura ambiente y 12 h a 4°C.
- Los cortes fueron incubados durante 30 min a temperatura ambiente.
- Se realizaron 4 lavados de 10 min en PBS-T 0,5%, para eliminar el exceso de anticuerpo primario.
- Se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a biotina (anti-IgG de ratón, hecho en caballo, *Vector Laboratories Inc.*) durante 1 h a temperatura ambiente a una dilución final de 1:1000 en una dilución al 10% de gelatina, 3% en suero fetal bovino en PBS-T 0,5%.
- Se realizaron 3 lavados de 8 min en PBS-T 0,5% para eliminar el exceso de anticuerpo secundario.
- Se realizaron 3 lavados de 5 min en PBS.
- Se incubó durante 1 h con una solución avidina-estreptavidina-peroxidasa (kit comercial ABC, *Vector Laboratories Inc.*) en proporción 3µl del compuesto A y B por mililitro de PBS. Esta solución se preparó al menos 20 min antes de su utilización para asegurar la formación de los complejos.
- Se llevaron a cabo 3 lavados de 8 min en PBS-T 0,5%.
- Se realizaron 3 lavados de 5 min en PBS.
- Se reveló usando un kit comercial de revelado por pastillas (SigmaFAST DAB with metal enhancer, *Sigma-Aldrich*) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los cortes

3. MATERIALES Y MÉTODOS

fueron incubados el tiempo necesario para ver la señal correspondiente al marcaje de Calbindina.

- La reacción fue parada retirando el exceso de solución de revelado lavando con PBS.
- Los cortes fueron montados en portaobjetos empleando solución de montaje y dejándolos secar durante 48 h.
- Se sumergieron en xilol durante 5 min.
- Se cubrieron con DPX y cubreobjetos y se dejaron secar al menos, 96 h.
- Los restos de DPX fueron retirados con una cuchilla y etanol al 70%.

Las preparaciones fueron conservadas a temperatura ambiente hasta su posterior visualización.

6.3. Inmunofluorescencia.

En este caso, la reacción del antígeno-anticuerpo se hace visible gracias al acoplamiento del anticuerpo secundario con fluorocromos. Esta técnica permite la inmunodetección de múltiples antígenos siempre que se utilicen las combinaciones adecuadas de anticuerpos secundarios y fluoróforos. También permite la realización de estudios de colocación de diferentes marcajes. Para llevarla a cabo, realizamos el siguiente protocolo para cortes flotantes en agitación (modificado de Ruiz y col., 2011):

- Se realizaron 3 lavados de 5 min en PBS para eliminar el exceso de anticongelante de los tejidos.
- Los tejidos fueron impermeabilizados durante 1 h en PBS 1% Tritón-X-100 (PBS-T 1%).
- Se bloquearon las uniones inespecíficas del anticuerpo primario incubando con 5% de albúmina de suero bovino (BSA, *Sigma-Aldrich*) en PBS-T 1% durante 1 h.
- Los tejidos fueron incubados durante 12 h a 4°C en una solución que contenía al anticuerpo primario en la dilución adecuada (ver **tabla 6**) en un tampón conteniendo 1% BSA en PBS-T 1%.

ANTÍGENO	CONCENTRACIÓN	HUÉSPED	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
53BP1	1:1000	Conejo	Santa cruz biotechnology	sc- 22760
PSD-95	1:100	Conejo	Santa cruz biotechnology	sc- 28941
GEFIRINA	1:250	Cabra	Santa cruz biotechnology	sc- 6411
C-FOS	1:1000	Conejo	Santa cruz biotechnology	sc- 52
EGR-1	1:1000	Conejo	Santa cruz biotechnology	sc- 110

Tabla 6. Descripción de anticuerpos primarios, concentraciones de uso, huéspedes, casa comercial y referencias de los mismos.

- Los cortes fueron incubados 30 min a temperatura ambiente.
- Se realizaron 6 lavados de 10 min en PBS-T 0,1%.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

- Se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo deseado (ver **tabla 7**), en una solución al 1% en BSA y PBS-T 0,1% durante 1 h a temperatura ambiente.

ANTÍGENO	CONCENTRACIÓN	HUÉSPED	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
ANTI-IgG-CONEJO 488	1:400	Burro	Santa cruz biotechnology	sc- 362261
ANTI-IgG-RATÓN AlexaFluor 594	1:500	Burro	Life technologies	A21203
ANTI-IgG-CABRA AlexaFluor 647	1:500	Burro	Life technologies	A21447

Tabla 7. Descripción de anticuerpos secundarios, concentraciones de uso, huéspedes, casa comercial y referencias de los mismos.

- Se incubó durante 5 min con una dilución 1:5000 de DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol, *Sigma-Aldrich*) (proveniente de un stock concentrado a 1mg/ml) en una solución al 1% en BSA y PBS-T 0,1%, para marcar los núcleos celulares.
- Se realizaron 6 lavados de 10 min con PBS-T 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y del DAPI.
- Se realizaron 2 lavados de 10 min en PBS para eliminar los restos del detergente.
- Los cortes fueron montados en portaobjetos empleando glicerol (*Sigma-Aldrich*) al 50% diluido en agua, y cubiertos con un cubreobjetos. Se selló con laca de uñas y se dejó secar en oscuridad.

Las preparaciones fueron conservadas en oscuridad y a 4°C para evitar así la pérdida de fluorescencia de las muestras.

6.4. Captura y análisis de las imágenes.

Las preparaciones de inmunohistoquímica y Nissl, fueron visualizadas con un microscopio óptico (Leica DMRB RFY HC) acoplado a una cámara fotográfica (Leica DC500) para su captura. Las imágenes de las preparaciones obtenidas mediante inmunofluorescencia fueron tomadas con un microscopio confocal de fluorescencia (Leica SPE DM 2500).

Para analizar cada uno de los marcajes obtenidos empleamos el programa de análisis de imagen Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>). Se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- **Cuantificación de áreas:** Se seleccionó la región de estudio con la herramienta de trazado libre. Posteriormente, elegimos la opción de medida "MEASURE". En el caso de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, la medición del área se realizó en la proyección máxima de las mismas (20 secciones de 2,5µm de separación entre ellos y por cada corte) para cada uno de los canales de captura.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Cuantificación de células positivas para un determinado marcaje:** Para las imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia, utilizamos la herramienta adicional del programa Fiji, llamada "CELL COUNTER". Esta herramienta nos permite realizar un conteo manual de las células que presentan el marcaje esperado bajo un criterio óptimo de selección ajustado en cada caso. El análisis del número de células totales se realizó en la proyección máxima de las imágenes y en cada uno de los canales de captura. Para las preparaciones de microscopía óptica, utilizamos la opción semiautomática de "FIND MAXIMA" existente en el programa Fiji. Esta opción se basa en la detección de los puntos de máxima intensidad pudiendo aplicarle una tolerancia de ruido ajustada para cada marcador y experimento, siempre y cuando las condiciones aplicadas en la adquisición de las imágenes (ganancia, contraste, brillo...) sean las mismas para los diferentes grupos experimentales.
- **Cuantificación del balance excitación/inhibición mediante los marcadores específicos para elementos postsinápticos de las sinapsis (PSD-95 y Gefirina):** Las imágenes fueron tomadas en 10 secciones dejando 1µm de separación entre ellas. Posteriormente, se realizó la proyección máxima de estas 10 secciones y mediante la herramienta "THRESHOLD" seleccionamos el umbral de intensidad válido para cada uno de los marcajes postsinápticos. Después de esto, realizamos una medida de intensidad de fluorescencia mediante la herramienta "HISTOGRAM".
- **Representación en superficie ("plot") de la intensidad de fluorescencia:** se realizó la proyección máxima de las 10 secciones tomadas para el análisis de clústeres de PSD-95 y Gefirina. Posteriormente, seleccionamos la herramienta "SURFACE PLOT", marcando las opciones: polygon multiplier (10-200%) 100; shade; draw axis; fill plot background with black; smooth. En este tipo de representación, se establece una relación entre la intensidad de fluorescencia por cada píxel de la imagen y para cada marcaje.

Para el estudio de las imágenes se analizaron como mínimo 4 cortes de hipocampo y corteza prefrontal por cada animal. Todas las imágenes fueron capturadas en la misma sesión y manteniendo los mismos parámetros (brillo, contraste, ganancia, potencia de láseres, etc.). Además, todos los análisis fueron realizados por el mismo experimentador sin conocer el tratamiento, el genotipo y/o la manipulación que había recibido cada animal.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el programa PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Todos los datos fueron representados como media \pm SEM. La comparación de dos grupos experimentales fue realizada usando t-tests independientes de comparaciones múltiples. La comparación de más de dos grupos fue analizada por el análisis de la varianza (ANOVA) de una o de dos vías, incluyendo un test post hoc con la corrección de Bonferroni. En todos los análisis se consideró como diferencia estadística aquella donde $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

I. ACTIVACIÓN NEURONAL Y REORGANIZACIONES GENÓMICAS:

1. RETROTRANSPOSICIÓN DE LINE-1.

La retrotransposición neuronal de LINE-1 (L1) se ha postulado como un mecanismo generador de diversidad neuronal durante el desarrollo del cerebro. En el cerebro adulto, estudios previos muestran como la expresión de L1 puede verse alterada tras ciertos factores ambientales tales como el ejercicio físico (Muotri y col., 2009) o el estrés (Ponomarev y col., 2010). Sin embargo, no está establecido si existe retrotransposición de L1 en el adulto, ni el papel funcional que podría tener en este contexto.

1.1- La exploración de un nuevo entorno provoca cambios en la retrotransposición de L1 en el hipocampo de ratón.

Para saber si la expresión de L1 se afecta tras la exploración de un entorno enriquecido (AR, **A**mbiente **R**ico) se estudió la expresión de ARNm para orf1 y orf2 por PCR semicuantitativa en hipocampos de ratones sacrificados entre 0,5 y 24 horas tras la sesión de exploración y ratones no estimulados (**Fig. 1A**). Los resultados obtenidos mostraron un incremento rápido y transitorio en la expresión de orf1 y orf2 en los ratones sacrificados 1 h tras la sesión de exploración (**Fig. 1B; Tabla ANEXO 2A**). Además, del mismo experimento anteriormente descrito se extrajo el ADN genómico hipocampal y se estimó el número de inserciones de ORF1 y ORF2. Los resultados mostraron un aumento en el número de inserciones de ORF2, 1 h tras la sesión de exploración. Sin embargo, la exploración no afectó al número de inserciones de ORF1 en el hipocampo (**Fig. 1C; Tabla ANEXO 2B**).

1.2.- La inhibición farmacológica de la neurotransmisión glutamatérgica bloquea la retrotransposición de L1 inducida por la exploración de un ambiente rico, en el hipocampo del ratón.

A continuación quisimos conocer si el incremento de retrotransposición de L1 era dependiente de la activación neuronal producida por la exposición al AR. Para ello, se determinó el número de inserciones de L1 en el genoma de hipocampos de ratones sacrificados 1 h después de la exploración de un AR en presencia o ausencia de una mezcla de inhibidores de las sinapsis glutamatérgicas (CPP, 5mg/kg, y NBQX, 1mg/kg), administrados 30 min antes de la sesión de exploración (**Fig. 2A**). Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con inhibidores glutamatérgicos bloqueaba el incremento en la inserción genómica *de novo* de L1 (**Fig. 2B; Tabla ANEXO 3**).

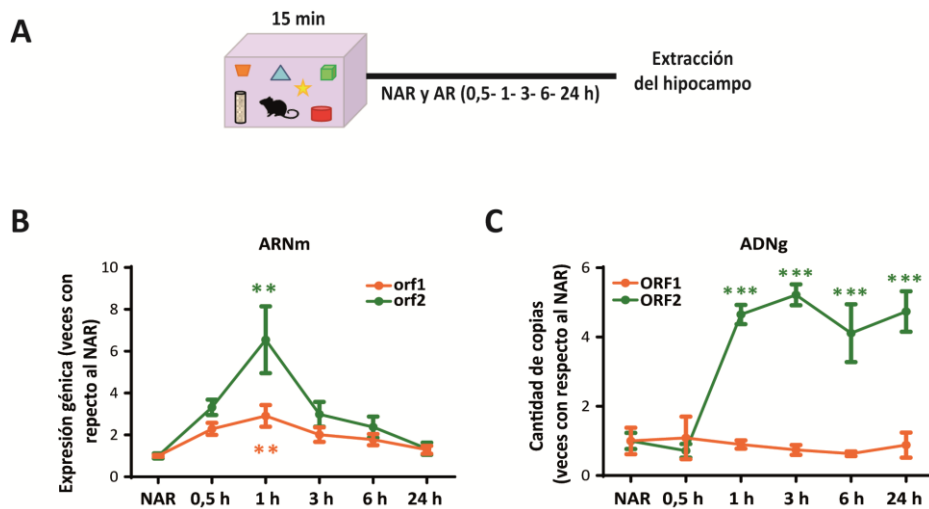


Figura 1. La exploración de un ambiente nuevo provoca la inserción genómica de novo de L1 en el hipocampo. (A) Esquema de la manipulación conductual y los tiempos de sacrificio de los ratones. **(B)** Análisis de la expresión génica y de la inserción genómica **(C)** de orf1 y orf2 en el hipocampo de ratones sacrificados a diferentes tiempos tras una sesión de exploración de un entorno enriquecido. Los datos se representan relativizados con respecto la expresión de un gen constitutivo, gapdh para la expresión génica y LPLg para estimar las inserciones genómicas, y normalizados con respecto al valor obtenido para el grupo de no ambiente rico. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico; n=4-5 ratones por grupo; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

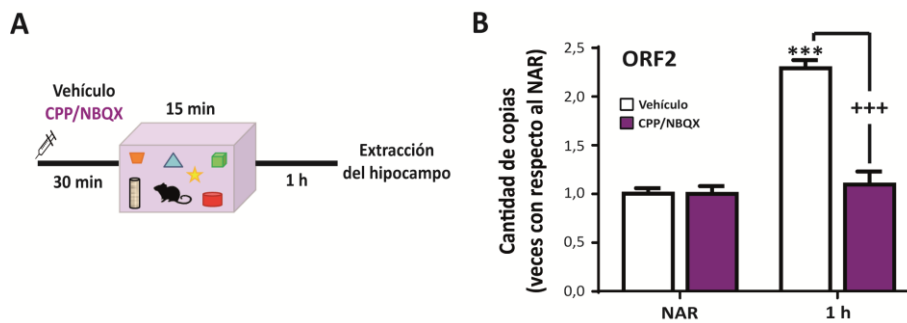


Figura 2. La retrotransposición de novo de L1 inducida por exploración de un ambiente rico (AR) es bloqueada por inhibidores de la transmisión glutamatérgica. (A) Esquema del diseño experimental y de la administración del vehículo o de la mezcla CPP/NBQX, 30 min antes de la exposición al AR. **(B)** Estimación del número de inserciones de ORF2 en el hipocampo de ratones sacrificados 1 h tras la exposición al AR en ausencia o presencia de los bloqueantes glutamatérgicos. Los datos se representan relativizados con respecto al gen LPLg y normalizados con respecto al valor de inserción obtenido para el no ambiente rico. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico; n=4-5 ratones por grupo; *representa diferencias estadísticas entre ratones no expuestos y expuestos al ambiente rico; +representa diferencias entre ratones tratados con vehículo o con CPP/NBQX en un mismo tiempo; un símbolo: $p < 0,01$; tres símbolos: $p < 0,001$.

1.3.- La administración de bloqueantes de la retrotranscripción inhiben la activación de L1 sin afectar a la expresión de los genes de respuesta temprana dependientes de actividad en el hipocampo de ratón.

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la inhibición farmacológica de la retrotransposición bloqueaba la formación de memorias duraderas en el test de evitación pasiva. Por ello, administramos sistémicamente aciclovir y lamivudina, inhibidores de la transcriptasa inversa, tras una sesión de exploración de un AR y se estimó la inserción de L1 en el hipocampo de ratones 2 h después de finalizar la exploración de un AR. Los resultados obtenidos mostraron que la administración de ambos inhibidores de la retrotranscripción bloqueaban la inserción *de novo* de ORF2 sin afectar a la inserción de ORF1 (Fig. 3; Tabla ANEXO 4A y B).

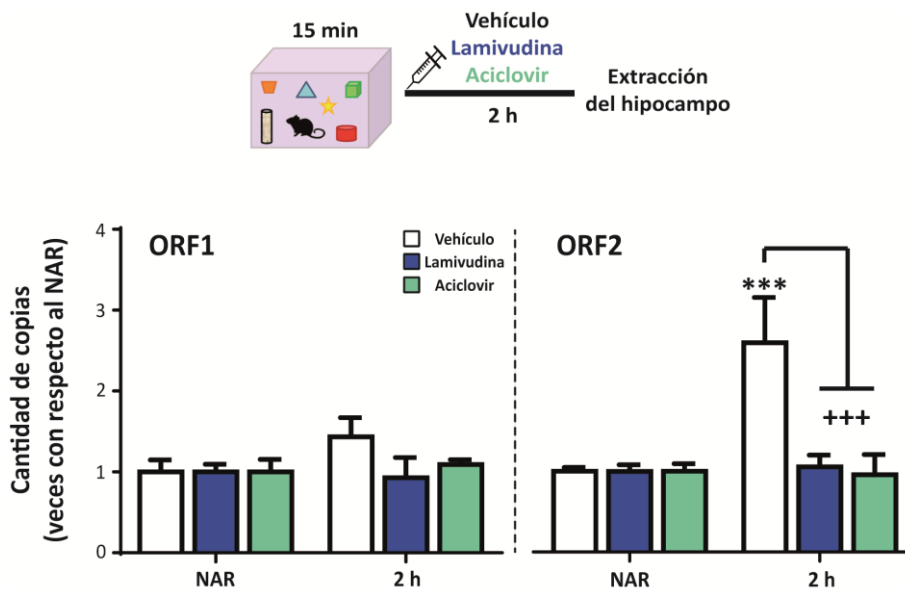


Figura 3. La administración de inhibidores de la actividad retrotranscriptasa inhibe la inserción *de novo* de ORF2 inducida por un AR. Esquema del diseño experimental de la administración del vehículo y de los inhibidores de la retrotranscripción Lamivudina y Aciclovir inmediatamente tras la exposición a un AR. Estimación del número de copias de ORF1 y ORF2 en el ADN genómico del hipocampo de ratones sacrificados 2 h tras la exposición a un AR en ausencia o en presencia de los inhibidores de la actividad retrotranscriptasa. Los datos se representan relativizados con respecto al gen LPLg y normalizados con respecto al valor obtenido para el grupo no sometido a un AR. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico; n=5-6 ratones por grupo; *representa diferencias estadísticas entre ratones no expuestos y expuestos al ambiente rico; +representa diferencias entre ratones tratados con vehículo o con Lamivudina o Aciclovir en un mismo tiempo; tres símbolos: $p < 0,001$.

La exploración de un nuevo entorno provoca cambios en la plasticidad sináptica (Rampon y col., 2000) provocando la síntesis de nuevas proteínas (Inda y col., 2005; Romero-Granados y col., 2009), entre ellas las proteínas c-Fos y Egr1, productos de genes de activación temprana dependientes de actividad neuronal (Guzowski y col., 2015). Para conocer si el efecto de los inhibidores era específico para la retrotransposición, o si el efecto era más general actuando sobre cambios en la expresión génica, realizamos inmunofluorescencias

4. RESULTADOS

contra c-Fos y Egr1 en cerebros de ratones sacrificados 2 h después de una sesión de exploración de un AR en presencia o en ausencia de Lamivudina y Aciclovir (**Fig. 4A**). La exposición a un AR incrementó, entre 2 y 3 veces, el número de células c-Fos y Egr1 positivas en el giro dentado del hipocampo (**Fig. 4B y C**, respectivamente). Además, el tratamiento con los inhibidores de la retrotranscripción no afectó a la inducibilidad debida a la exposición a un AR (**Tabla ANEXO 5**).

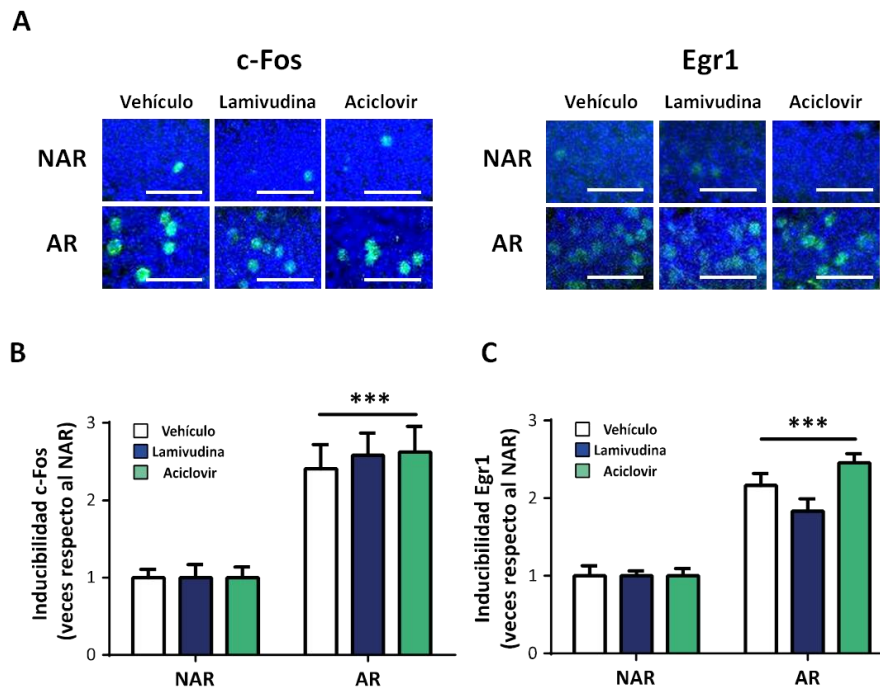


Figura 4. Los inhibidores de la actividad retrotranscriptasa no afectan a la inducibilidad de la expresión de c-Fos y Egr1. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra c-Fos y Egr1 (señales verdes) en giros dentados de ratones sacrificados 2 h después de ser expuestos y no expuestos a un AR en presencia o ausencia de Lamivudina y Aciclovir. Barra de calibración de las imágenes: 50µm. (B y C) Inducibilidad de la expresión de c-Fos y Egr1 en el giro dentado del hipocampo. Los datos de células positivas para c-Fos y Egr1 se representan relativizados con respecto al valor obtenido para el no ambiente rico en cada uno de los tratamientos. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico; n=5 ratones por tiempo y grupo farmacológico; *representa diferencias estadísticas entre ratones no expuestos y expuestos al AR; ***p<0,001.

1.4.- La administración de oligonucleótidos antisentido contra ORF1 y ORF2 reduce la formación de memoria a largo plazo en el test de evitación pasiva.

Para bloquear la inserción genómica *de novo* de L1, diseñamos dos Oligonucleótidos AntiSentido (OASs) dirigidos contra la secuencia del ARNm de orf1 y orf2. La eficiencia de los OASs fue probada mediante su administración en el hipocampo de ratones 30 min antes de la exploración de un AR. Los cambios en la inserción *de novo* de L1 dependiente de actividad, se probaron en el hipocampo de ratones sacrificados 2 h después de la exploración. La cuantificación de la cantidad de ORF2 genómico, mostró un bloqueo de la inserción de L1 dependiente de exploración en los ratones administrados con los OASs específicos, comparado

4. RESULTADOS

con aquellos administrados con OAS de secuencia aleatoria (“Random”) (Fig. 5A; Tabla ANEXO 6A).

Para comprobar la eficiencia de los OASs en los procesos de aprendizaje y memoria, estos fueron administrados en el hipocampo 30 min antes de la sesión de entrenamiento del test de evitación pasiva (Fig 5B). La evaluación de la memoria a corto plazo (MCP) y a largo plazo (MLP), 1 o 72 h tras el entrenamiento, respectivamente, mostró que la administración de ambos OASs provocaba un decremento en la formación de la MLP, sin afectar a la MCP (Fig. 5B; Tabla ANEXO 6B y C).

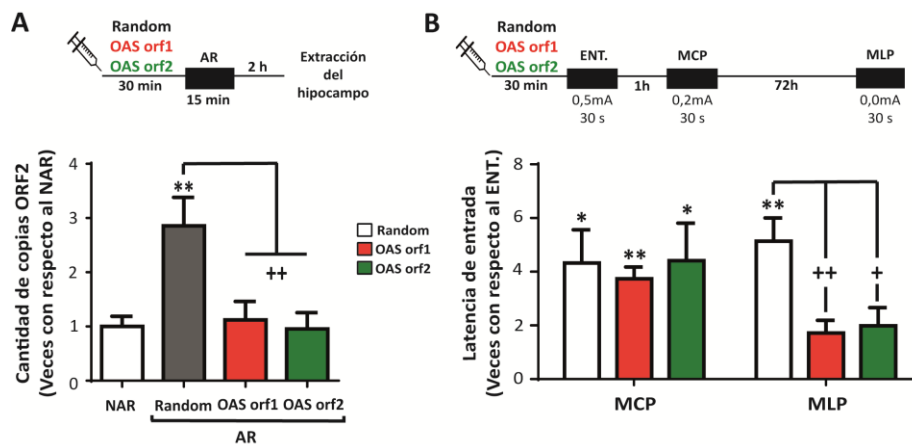


Figura 5. La inhibición genética de la retrotranscripción de L1 en el hipocampo de ratón bloquea la formación de memoria a largo plazo. (A) Esquema del diseño experimental de administración de los OASs y del protocolo de activación neuronal. Cuantificación de la cantidad de copias ORF2 en ratones sometidos a dicho protocolo. Los datos de inserción genómica ORF2 fueron relativizados respecto al gen LPLg y se normalizaron con respecto al valor obtenido para el no ambiente rico. *representa diferencias estadísticas entre ratones NAR y AR; +representa diferencias entre ratones tratados con los diferentes OASs en el AR. (B) Esquema del diseño experimental de la administración intrahipocampal de oligonucleótidos antisentido (OAS) contra orf1 y orf2 y del protocolo de la prueba de evitación pasiva. Efecto de la administración hipocampal de los OASs en la prueba de evitación pasiva. *representa diferencias estadísticas con respecto al entrenamiento; +representa diferencias estadísticas en una misma sesión. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico; OASs: Oligonucleótidos AntiSentidos; ENT.: Entrenamiento; n=4-7 ratones por tiempo y grupo de administración; un símbolo: $p < 0,05$; dos símbolos: $p < 0,001$; tres símbolos: $p < 0,001$.

2. ACTIVACIÓN NEURONAL Y ROTURA-REPARACIÓN DEL ADN

Para que ocurran las reorganizaciones genómicas, el ADN neuronal ha de romperse y ser reparado. Se ha demostrado que la exploración de un AR provoca roturas de doble cadena en el ADN (Suberbielle y col., 2013), sin embargo no está establecido qué papel funcional podrían tener en el cerebro adulto.

4. RESULTADOS

2.1.- La exposición a un ambiente enriquecido provoca cambios secuenciales en la activación de la proteína 53BP1 en el giro dentado y en la corteza prefrontal del ratón.

Una de las proteínas marcadoras de las roturas en el ADN, es 53BP1 (Zimmermann y de Lange, 2014). Para estudiar si la activación neuronal provoca roturas del ADN, realizamos una inmunofluorescencia contra la proteína 53BP1 (caracterizada por su marcaje en focos cuando es reclutada sobre el ADN dañado, ver **Fig. 6A**) en el giro dentado del hipocampo y en la corteza prefrontal de ratones sacrificados a 1, 3, 6 y 24 h tras la sesión de exploración de un AR o no expuestos. El porcentaje de células con focos 53BP1+ se duplicó 3 h después de la exposición a un AR en el giro dentado del hipocampo y este incremento retornó a los niveles basales 24 h después de la sesión de exploración. Por otro lado, en la CPF encontramos que el aumento en el porcentaje de células con focos 53BP1+, se produjo de forma más tardía siendo su máximo a las 24 h tras la sesión de exploración (**Fig. 6B; Tabla ANEXO 7**).

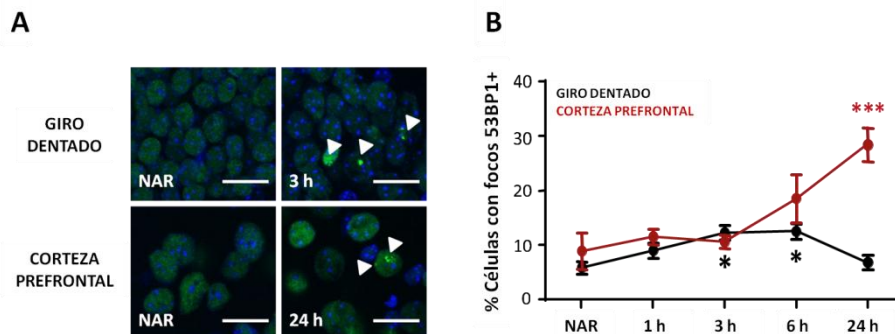


Figura 6. La exploración de un AR provoca un aumento de células con focos positivos para 53BP1 en el giro dentado del hipocampo y en la corteza prefrontal de ratón. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra la proteína 53BP1 (verde) y un marcador de núcleo celulares (DAPI, azul) en el giro dentado y en la corteza prefrontal de ratones NAR y AR sacrificados a las 3 h o a las 24 h. Las puntas de flecha indican la presencia de focos de activación de la proteína 53BP1. **(B)** Cuantificación del porcentaje de células con focos 53BP1+ en el hipocampo y en la corteza prefrontal de ratones no expuestos y expuestos a la sesión de exploración del AR y sacrificados entre 1 y 24 h tras esta sesión. NAR: No Ambiente Rico. n=5 ratones por tiempo. *representa diferencias estadísticas con respecto al NAR. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Barra de calibración: 20 μ m.

2.2.- La exposición a un nuevo entorno enriquecido provoca cambios secuenciales en la expresión de genes relacionados con el metabolismo del ADN en el hipocampo y en la corteza prefrontal de ratones.

A continuación, quisimos comprobar si la expresión de los genes relacionados con la rotura y la reparación del ADN, se veía alterada tras la exposición a un AR. Para ello, se aislaron ARNm de hipocampos y CPF de ratones sacrificados entre 1 y 24 h después de la exploración de un AR y ratones no expuestos. Mediante PCR semicuantitativa, se analizó la expresión de genes relacionados con los procesos de rotura y reparación del ADN. Generalizando, los valores máximos de expresión de estos genes en el hipocampo se encontraron 1 h tras la exposición al

AR, volviendo a su expresión basal a las 24 h. Por el contrario en la CPF, estos mismos genes incrementaron su expresión entre 6 y 24 h tras la exposición al AR (Fig. 7; Tabla ANEXO 8).

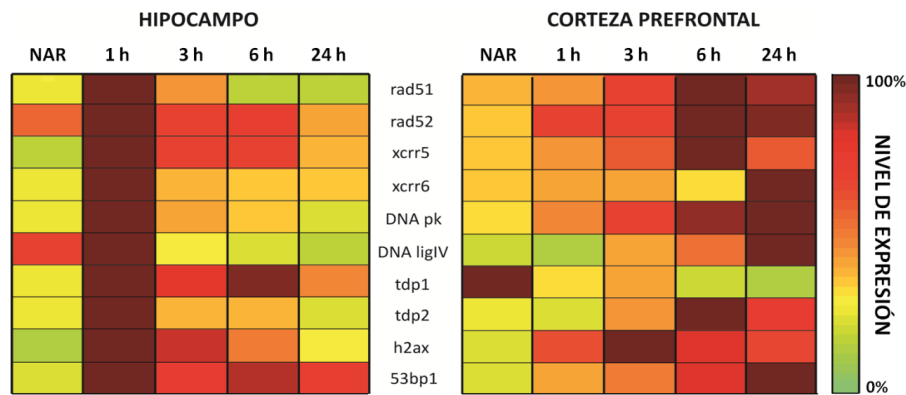


Figura 7. La exposición a un AR provoca cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo del ADN en el hipocampo y en la corteza prefrontal del ratón. Representación colorimétrica de la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con el metabolismo del ADN en hipocampo y corteza prefrontal procedente de animales sacrificados entre 1 y 24 h tras una sesión de exploración de un nuevo AR. Los resultados de la amplificación fueron normalizados frente a un gen de expresión constitutiva (β -actina) y relativizados con respecto al tiempo cuya expresión es máxima (100%). Para esta representación se estableció una escala colorimétrica donde el valor máximo de expresión de cada gen aparece en rojo intenso, mientras que en función de la diferencia con este valor, empiezan a aparecer tonos menos intensos siendo la expresión nula de color verde. NAR: No Ambiente Rico.

2.3.- La inhibición local de proteínas involucradas en procesos de rotura y reparación del ADN en el hipocampo provoca alteraciones en la formación de memorias en la prueba de evitación pasiva.

Para conocer si la inhibición local en el hipocampo de la expresión de proteínas codificadas por genes de rotura y reparación podría participar en los procesos cognitivos, diseñamos OASs específicos para inhibir la expresión de TDP1, TDP2 y H2AX. Estos OASs fueron administrados 30 min antes de la sesión de entrenamiento y se evaluó la MCP y la MLP en la prueba de evitación pasiva (Fig. 8A). La evaluación de la MCP no reveló diferencias entre los ratones inyectados con la secuencia Random y los OASs específicos para cada gen (Fig. 8B). Sin embargo, la administración de OASs específicos para cada gen, disminuyó significativamente la formación de la MLP comparado con los ratones administrados con una secuencia Random (Fig. 8C; Tabla ANEXO 9A y 9B).

Para verificar que las alteraciones observadas en la evaluación de la formación de la memoria en el test de evitación pasiva eran debidas a que la administración de los OASs disminuía la expresión de sus genes específicos, los ratones fueron expuestos a una sesión de exploración de un AR durante 15 min en presencia y en ausencia de cada uno de los OASs (Fig. 8D). El análisis de la expresión de los ARNm de estos genes en hipocampos de ratones sacrificados 2 h después de esta sesión y ratones que no exploraron, mostraron una

4. RESULTADOS

disminución significativa en la inducibilidad de la transcripción de cada uno de los genes bloqueados en comparación a los ratones inyectados con la secuencia Random (Fig. 8E; Tabla ANEXO 9C).

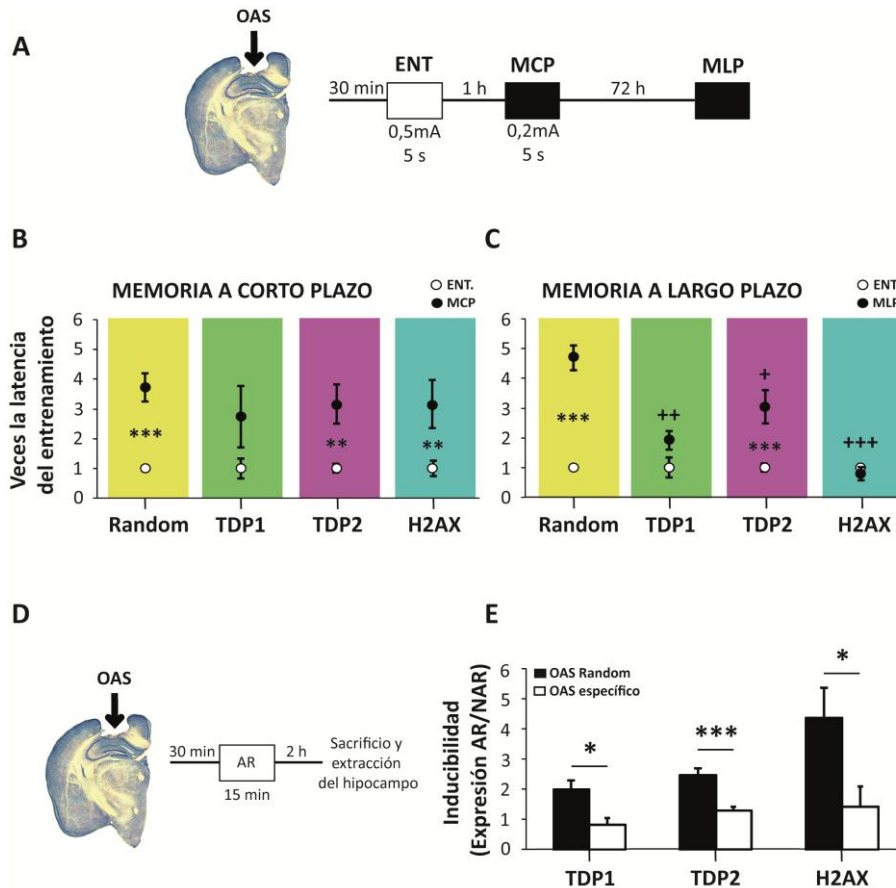


Figura 8. El bloqueo transitorio de la expresión de TDP1, TDP2 y H2AX por administración de OASs en el hipocampo de ratón provoca déficits en la formación de la memoria. (A) Esquema representativo del diseño experimental de las administraciones de los OASs y del protocolo de evitación pasiva. Representación de la MCP (**B**) y MLP (**C**) de ratones administrados con los diferentes ASOs, expresado como el número de veces la latencia del entrenamiento. *representa diferencias estadísticas con respecto al entrenamiento; +representa diferencias estadísticas en una misma sesión. ENT.: Entrenamiento; MCP: Memoria a Corto Plazo; MLP: Memoria a Largo Plazo. (**D**) Esquema representativo del protocolo de administración intrahipocampal de los diferentes OASs. (**E**) Inducibilidad de la expresión génica (AR/NAR) para cada gen bloqueado. Los datos para el análisis de la inducción de la expresión génica, fueron normalizados con respecto al gen de expresión constitutiva β -actina. *representa diferencias estadísticas con respecto a la inducibilidad del OAS Random. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico. OAS: Oligonucleótidos AntiSentido. n para OAS Random: 21; TDP1: 7; TDP2: 13; H2AX: 7. Un símbolo: $p < 0,05$; dos símbolos: $p < 0,01$; tres símbolos: $p < 0,001$.

En conjunto, nuestros datos sugieren que la retrotransposición de L1 y los eventos de rotura y reparación del ADN podrían ser necesarios en los procesos dependientes de actividad, entre ellos la formación de memoria duradera. Además, ambos procesos podrían participar en la generación de alteraciones genómicas en el hipocampo adulto.

II: CARACTERIZACIÓN DEL RATÓN CARENTE DE H2AX (H2AX^{-/-})

La señalización de las roturas en el ADN es un punto clave para el mantenimiento de la integridad celular. Uno de los marcadores más ampliamente usados como sensor del daño en el ADN, es la fosforilación en la serina 139 de una variante de la histona H2A, denominada H2AX. Para conocer el papel de esta proteína en la función del sistema nervioso realizamos la caracterización a nivel molecular y conductual de un modelo murino mutante nulo para H2AX (H2AX^{-/-}).

1.- DESCRIPCIÓN ANATÓMICA E HISTOLÓGICA.

1.1.- Estudio anatómico del cerebro de ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}.

Para empezar, realizamos un estudio comparativo del tamaño de ratones de 3 meses de edad para ambos genotipos. Los resultados obtenidos revelaron una disminución del 20% en el peso de los ratones H2AX^{-/-} (Fig. 9A). A continuación, usando la tinción de Nissl realizamos un estudio comparativo del tamaño del hipocampo, la amígdala y el tercer ventrículo dorsal (Fig. 9B, parte superior). Debido a la diferencia de tamaño de ambos genotipos, las áreas cerebrales determinadas se relativizaron con respecto al área total de la sección cerebral cuantificada. Las cuantificaciones obtenidas mostraron un aumento del ~45% en el área relativa de la amígdala en el ratón mutante. Sin embargo, no se detectaron diferencias en el área relativa del hipocampo ni del tercer ventrículo dorsal (Fig. 9B; Tabla ANEXO 10).

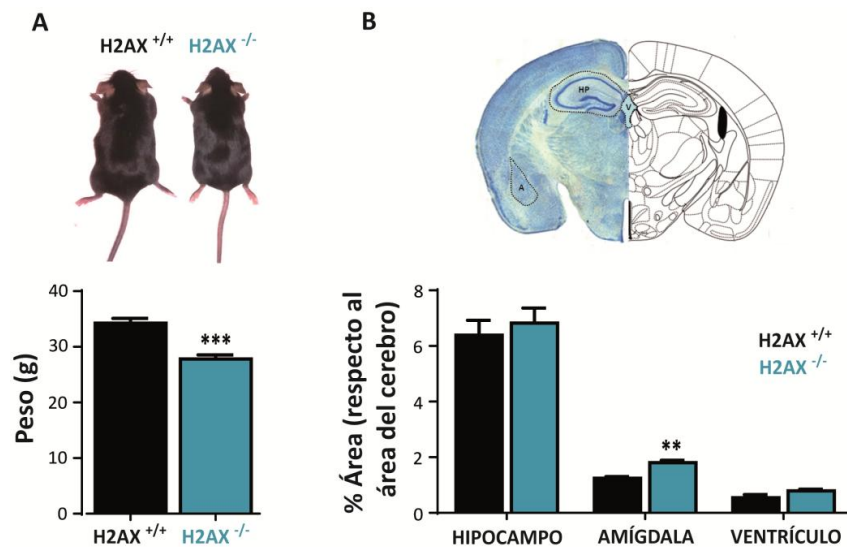


Figura 9. Los ratones H2AX^{-/-} presentan una disminución del peso y un aumento del tamaño relativo de la amígdala. (A) Fotografía representativa del tamaño de los animales H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-} y peso para ambos genotipos. (B) Imagen representativa de una hemisección coronal del cerebro de ratón teñido con la técnica de Nissl donde se muestran las áreas del hipocampo (HP), la amígdala (A) y el tercer ventrículo dorsal (V) (izquierda) en relación a su esquema estructural (derecha) obtenido del atlas neuroanatómico de ratón (Paxinos y Franklin, 1997). En la parte inferior aparece el porcentaje relativo del área que ocupa cada una de estas estructuras en cada genotipo, en relación al área total del corte. Para el estudio del peso: n H2AX^{+/+}=11 y n H2AX^{-/-}=10. Para el estudio de la morfología: n H2AX^{+/+}=3 y n H2AX^{-/-}=5. ** p<0,01; ***p<0,001.

1.2.- Estudio morfológico específico de neuronas maduras del hipocampo y la amígdala en el cerebro de ratones silvestres y mutantes H2AX^{-/-}.

Para realizar un estudio más detallado de la morfología cerebral, realizamos una inmunohistoquímica contra calbindina, como marcador de la población de neuronas maduras, y centramos nuestras cuantificaciones en el hipocampo y en la amígdala (Fig. 10A). La densidad celular de neuronas calbindina positivas (número de células Calbindina positivas en el área de estudio, mm²) en la amígdala fue similar en ratones silvestres y mutantes, aunque la amígdala de éstos tuviera mayor tamaño relativo (Fig. 10B). En el hipocampo cuantificamos el porcentaje de área que ocupa la capa granular, la capa molecular y las fibras musgosas (que representan somas, dendritas y axones de las células granulares del giro dentado) con respecto al área hipocampal total (Fig. 10C). El hipocampo de los ratones mutantes, muestra una disminución del ~20% en el área de la capa granular y en la capa molecular, sin cambio en las fibras musgosas (Tabla ANEXO 11).

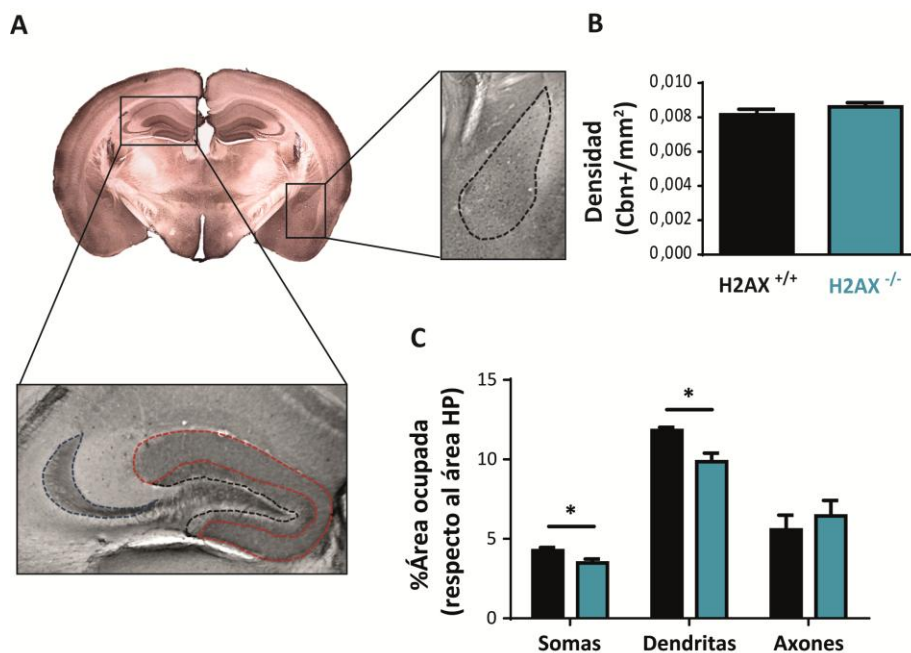


Figura 10. Los ratones H2AX^{-/-} presentan alteraciones en la capa granular y molecular del giro dentado del hipocampo. (A) Imagen representativa de inmunohistoquímica contra calbindina en cerebro. Insertos del área perteneciente a la amígdala y el hipocampo, destacando en el hipocampo en negro la capa granular, en rojo la molecular y en azul, las fibras musgosas. (B) Cuantificación de la densidad celular de células positivas para calbindina en el área total de la amígdala. (C) Cuantificación del porcentaje del área relativa con respecto al hipocampo de la capa granular, molecular y fibras musgosas de las células granulares del giro dentado del hipocampo de ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}. Cbn+: Células positivas para el marcaje de Calbindina. n=3 y 5 para ratones silvestres y H2AX^{-/-}, respectivamente. *p<0,05.

4. RESULTADOS

1.3.- Estudio sináptico y balance excitación/inhibición en el hipocampo, en la corteza prefrontal y en la amígdala del cerebro de ratones silvestres y mutantes nulos para H2AX.

Tras encontrar diferencias estructurales en los cerebros de los ratones H2AX^{-/-}, quisimos comprobar si la conectividad sináptica de estos animales también podría estar alterada. Para ello, realizamos una inmunofluorescencia doble contra dos proteínas de andamiaje postsináptico: PSD95 como marcador de sinapsis excitadoras y gefirina, para las inhibitoras (Fig. 11A). El análisis de la inmunofluorescencia para los marcadores postsinápticos reveló un aumento significativo del 51% en el balance de excitación/inhibición (medido como intensidad de fluorescencia de PSD95 frente a la obtenida para gefirina) en *stratum radiatum* de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo en los ratones H2AX^{-/-}. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la relación excitación-inhibición en la CPF, ni en la capa molecular del giro dentado, ni en la amígdala de los ratones silvestres y mutantes (Fig. 11B; Tabla ANEXO 12).

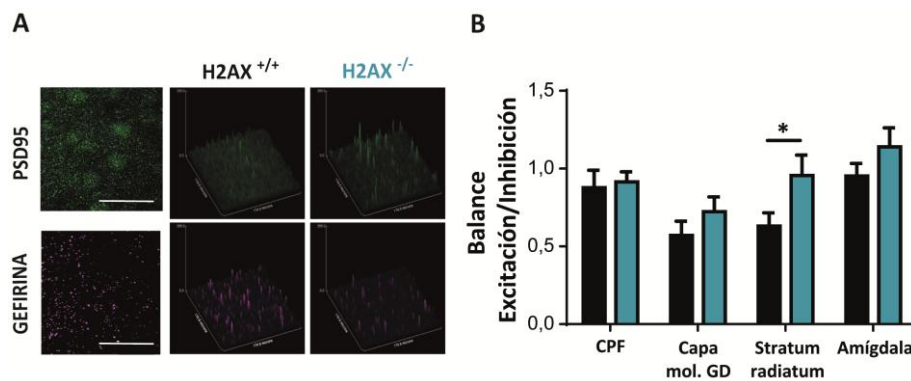


Figura 11. La carencia del gen h2ax provoca un desbalance en el ratio excitación/inhibición en las dendritas de CA1. (A) Imagen representativa obtenida por microscopía confocal de inmunofluorescencia contra PSD95 y gefirina en la corteza prefrontal de ratones H2AX^{+/+}. Representación gráfica de la proyección de intensidad máxima por superficie de estudio para ambos marcajes y genotipos en el stratum radiatum de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. **(B)** Cuantificación del balance excitación/inhibición (intensidad de fluorescencia de la proteína PSD95/ Intensidad de fluorescencia de la proteína gefirina). Barra de calibración de las imágenes de fluorescencia: 30µm. CPF: Corteza Prefrontal; Capa mol. GD: Capa molecular del giro dentado; n=3 y 5 para ratones silvestres y H2AX^{-/-}, respectivamente. *p<0,05.

2.- CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL.

Como se detectaron diferencias morfológicas en el cerebro de los ratones H2AX^{-/-}, quisimos saber si estas alteraciones modificaban los patrones conductuales de estos animales. Para ello, realizamos diferentes pruebas para evaluar las capacidades motoras, sensitivas, neurológicas y cognitivas de los ratones carentes de la histona H2AX.

Como consideración general, el resumen de los valores obtenidos en cada prueba y el valor del estudio estadístico obtenido para cada sesión y/o genotipo, aparecen representados en la **Tabla ANEXO 13**.

4. RESULTADOS

2.1.- Evaluación del comportamiento motor en los ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}.

Para estudiar el comportamiento motor de los ratones H2AX^{-/-} hemos cuantificado la actividad espontánea en campo abierto, la fuerza en las patas delanteras y la coordinación motora. La actividad espontánea en campo abierto se evaluó en dos sesiones de 15 y 5 min, respectivamente, espaciadas 24 h entre ellas. Los ratones silvestres y mutantes no mostraron diferencias en la actividad locomotora (**Fig. 12A**). Asimismo, la fuerza muscular (**Fig. 12B**) y la coordinación motora (**Fig. 12C**), fueron similares en ambos genotipos.

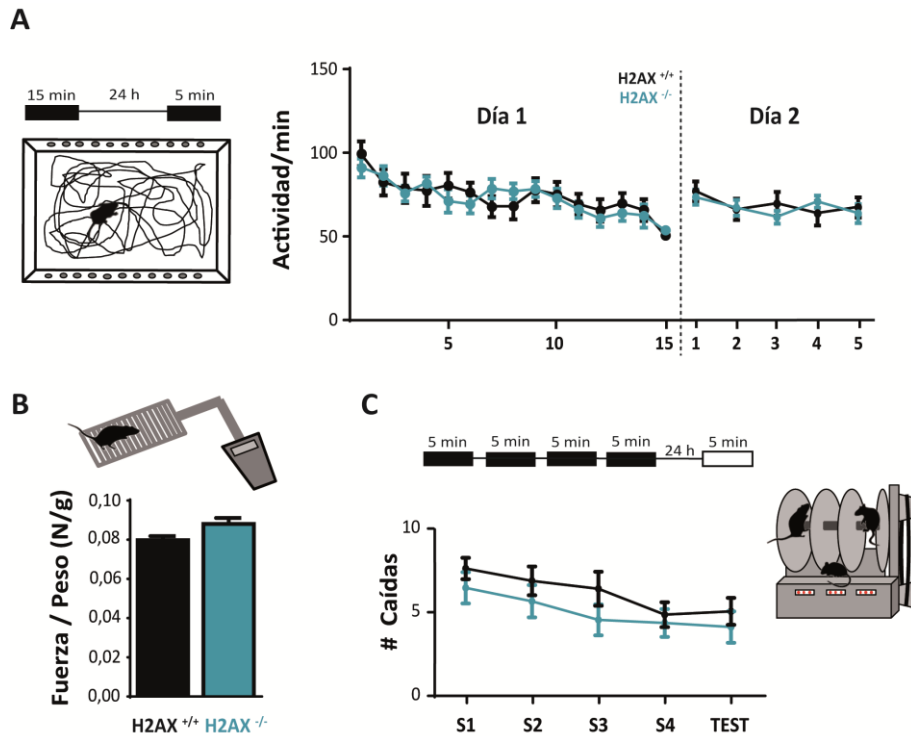


Figura 12. La carencia del gen h2ax no afecta a la capacidad motora. (A) Esquema del campo abierto y de las dos sesiones de exploración, de 15 y de 5 min, espaciadas 24 h entre ellas. A la derecha aparece la cuantificación de la actividad motora por minuto (número de roturas de haces infrarrojos, IR) en ambos genotipos. n=11 ratones por genotipo. **(B)** Esquema representativo del tensiómetro utilizado y cuantificación de la fuerza de agarre relativizado frente al peso, para ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}. n=8 y 5 para ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}, respectivamente. **(C)** Esquema representativo de un rotarod y del protocolo realizado (4 sesiones de entrenamiento de 5 min, dejando 1 min entre ellas, y evaluación del aprendizaje motor a las 24 h). Resultados del número de caídas por sesión. n=11 y 12 para ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}, respectivamente.

2.2.- Evaluación de las capacidades sensitivas en los ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}.

Para conocer si los ratones H2AX^{-/-} poseían alteraciones en sus capacidades sensitivas, se estudió la nocicepción y la respuesta de sobresalto ante estímulos acústicos de diferente intensidad. La nocicepción de los ratones H2AX^{-/-} mostraron un incremento significativo del tiempo de retirada de las patas a 47,5°C, aunque no se encontraron diferencias a temperaturas mayores (**Fig. 13A**). En relación a la prueba de sobresalto acústico, los ratones fueron expuestos a diferentes intensidades comprendidas entre 75 y 120 dB, presentadas de forma

4. RESULTADOS

aleatoria. Los resultados no mostraron diferencias en las latencias de inicio ni del pico de la respuesta entre los ratones silvestres y los mutantes, lo que sugiere que el reflejo de sobresalto es similar en ambos genotipos. Sin embargo, la amplitud del pico en los ratones $H2AX^{-/-}$ no cambió independientemente de la intensidad acústica aplicada en comparación con el incremento progresivo observado en los ratones silvestres (Fig. 13B).

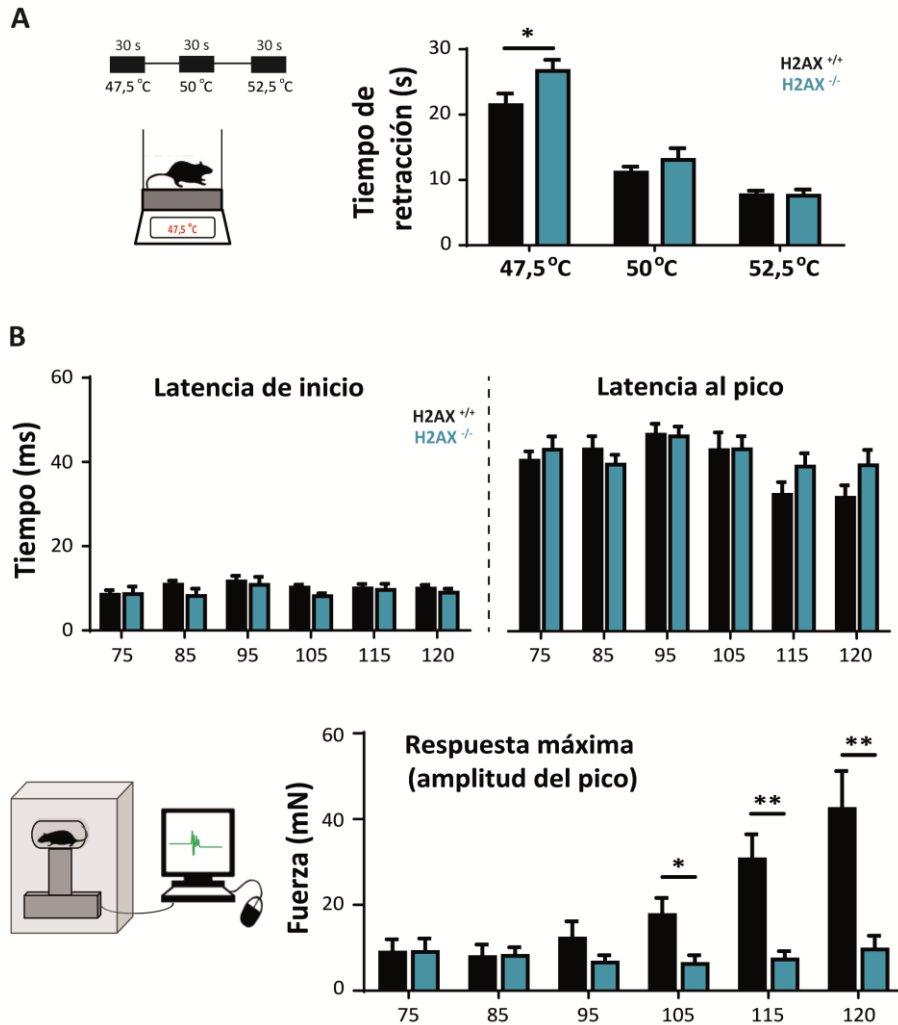


Figura 13. Los ratones $H2AX^{-/-}$ presentan alteraciones en las capacidades sensitivas. (A) Esquemas representativos de la placa caliente y del protocolo aplicado donde los ratones son expuestos a tres temperaturas diferentes (47,5-50-52,5°C) durante un máximo de 30 s. A la derecha aparece la medición de la latencia de retirada de las patas (s) para cada una de las temperaturas y para cada genotipo. **(B)** Esquema representativo del dispositivo utilizado para medir las respuestas tras estímulos acústicos a diferentes intensidades y cuantificación de los valores obtenidos de la latencia al inicio y al pico de la respuesta (medida en ms, parte superior) así como del pico máximo de respuesta (medida en mN, parte inferior) para cada una de las intensidades estudiadas y en cada uno de los genotipos. $n=11$ por genotipo. *representa diferencias significativas entre los genotipos a un mismo valor de intensidad. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

2.3.- Evaluación de la ansiedad y depresión en el modelo H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}.

El estado de ansiedad de los ratones H2AX^{-/-} fue evaluado en las pruebas del laberinto en cruz elevado en una sesión de 5 min de duración (**Fig. 14A**), el test de emergencia en una sesión de 5 min (**Fig. 14B**) y el enterramiento de canicas en una sesión de 10 min (**Fig. 14C**). Los resultados obtenidos para cada una de estas pruebas no revelaron diferencias significativas entre los ratones silvestres y los ratones mutantes.

Para la evaluación del estado de depresión, realizamos la prueba del nado forzado y de la preferencia a sacarosa. Para la prueba del nado forzado, realizamos una sesión de entrenamiento de 15 min y transcurridas 24 h, una sesión de 5 min. En esta última sesión evaluamos el tiempo de parálisis acumulado (s) (**Fig. 14D**). Los resultados obtenidos para esta prueba revelaron un aumento en el tiempo de parálisis acumulado en los ratones H2AX^{-/-}. En cuanto a la prueba de preferencia a sacarosa, como señal de anhedonia, los ratones fueron expuestos durante 4 días a 2 botellas diferentes con agua o sacarosa que se alternaban de posición aleatoriamente cada 12 h (**Fig. 14E**). Los resultados obtenidos para esta prueba mostraron una disminución de la preferencia del consumo de sacarosa en los ratones mutantes.

2.4.- Evaluación de la conducta social en los ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}.

Para conocer si los ratones H2AX^{-/-} presentaban algún tipo de anomalía en conducta social, realizamos las pruebas de interacción social y de formación del nido. En la prueba de interacción social se realizó el test de las tres cámaras donde se evaluó el tiempo de permanencia en cada compartimento, además del índice de preferencia social en distintas condiciones: exposición a dos objetos iguales, a un ratón familiar y un objeto, a un ratón extraño y un objeto, y a un animal familiar y otro extraño. El tiempo de permanencia en cada compartimento, así como el índice de preferencia de interacción social no fue significativamente diferente cuando los ratones fueron presentados individualmente; sin embargo, cuando los ratones tuvieron que elegir interactuar con individuos familiares y extraños, los ratones H2AX^{-/-} mostraron una clara preferencia por el animal familiar mientras que los ratones silvestres preferían la interacción con el ratón extraño (**Fig. 15A**). En la prueba de formación del nido, no se obtuvieron diferencias entre ambos genotipos (**Fig. 15B**).

4. RESULTADOS

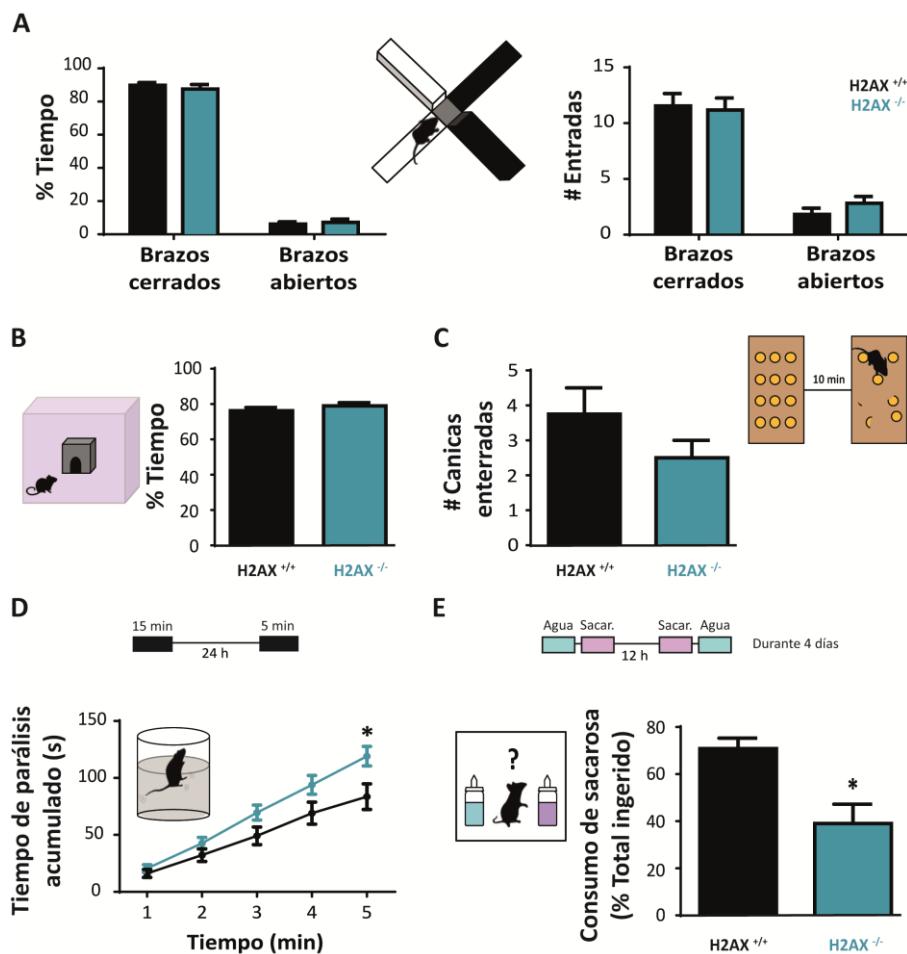


Figura 14. Los ratones H2AX^{-/-} presentan conducta depresiva. (A) Esquema representativo del laberinto en cruz elevado. Cuantificación del porcentaje del tiempo que los ratones permanecen en brazos abiertos y cerrados así como del número de entradas a cada uno de ellos para ambos genotipos. n=9 y 11 para H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}, respectivamente. (B) Esquema representativo de la arena y de la caja de escape, donde se realizó el test de emergencia. Cuantificación del porcentaje del tiempo que los ratones permanecieron en la periferia. n=11 ratones por genotipo. (C) Esquema representativo de la prueba de enterramiento de canicas y cuantificación del número de canicas enterradas tras una sesión de 10 min. n=5 y 2 para ratones H2AX^{+/+} H2AX^{-/-}, respectivamente. (D) Esquema representativo del nado forzado y del protocolo experimental. Cuantificación del tiempo de parálisis acumulado (s) en los 5 min de la segunda sesión. n=11 ratones por genotipo. (E) Esquema representativo del test de preferencia a sacarosa evaluado mediante la medición del consumo de agua y/o agua con sacarosa, presentados de forma aleatoria durante un periodo de 4 días. Cuantificación del porcentaje de sacarosa ingerida frente al total del volumen (agua + sacarosa) ingerido. n =5 y 2 para ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}, respectivamente. *representa diferencias significativas entre los genotipos en un mismo tiempo. *p<0,05.

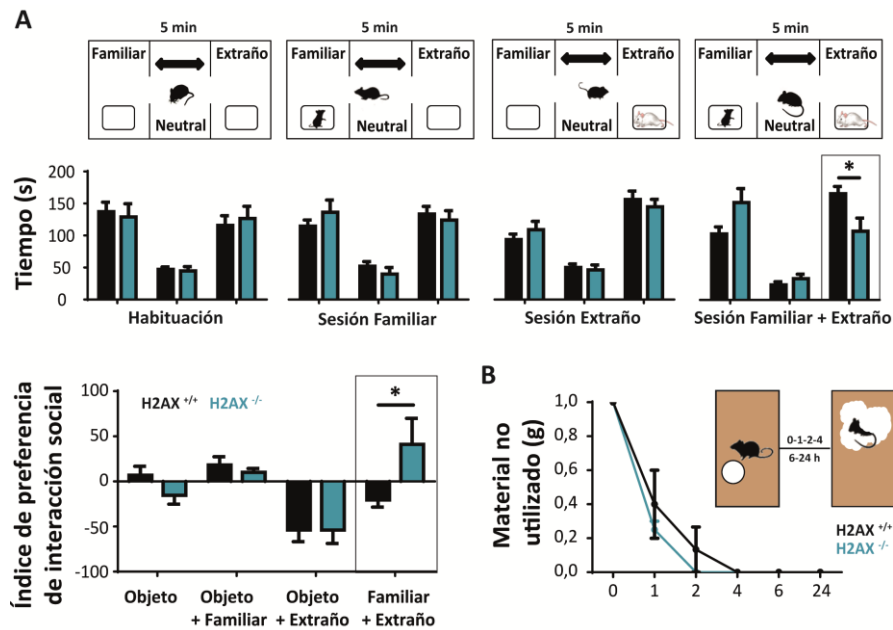


Figura 15. Los ratones H2AX^{-/-} presentan problemas en la interacción social únicamente en la sesión que el animal tiene que elegir entre el ratón familiar o el extraño. (A) Esquema representativo del test de tres cámaras de sociabilidad. La prueba se realiza en 4 sesiones de 5 min de duración: Habitación a dos objetos; Familiar (objeto y animal familiar); Extraño (objeto y animal extraño); Familiar+Extraño (animal familiar y animal extraño). Cuantificación del tiempo de permanencia (s) en cada compartimento de la caja de sociabilidad donde se encontraban los objetos y/o los animales. Además, se representa el índice de interacción social preferencial entendiéndose como tal la sustracción entre el tiempo de interacción entre: objetos (sesión de habituación); animal familiar-objeto (sesión familiar); objeto-animal extraño (sesión extraño); animal familiar-animal extraño (sesión Familiar+Extraño). n=9 para cada genotipo. **(B)** Esquema representativo de la formación del nido y cuantificación del peso del material no utilizado (g) para formarlo, evaluados entre 0 y 24 h. n=5 y 2 para ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}, respectivamente. *representa diferencias significativas entre los genotipos en una misma sesión. *p<0,05.

2.5.- Evaluación del aprendizaje y la memoria en ratones silvestres y mutantes para H2AX.

Para concluir, quisimos conocer si los ratones H2AX^{-/-} presentaban alteraciones cognitivas. Para ello, realizamos la prueba del laberinto en Y, una prueba de memoria de trabajo o inmediata (**Fig. 16A**). Esta prueba reveló una menor alternancia de visita a los brazos en los ratones H2AX^{-/-}, pese a presentar un número de entradas totales similares a los ratones silvestres.

Para evaluar la capacidad de aprendizaje y memoria, se realizaron dos pruebas que dependen del hipocampo y que poseen diferentes cargas emocionales: la prueba de reconocimiento de objetos (sin carga emocional) y la evitación pasiva (con un fuerte componente emocional). La prueba de reconocimiento de objetos consistió en una sesión de entrenamiento (ENT.) en la que los animales exploraban dos objetos idénticos, y 1 o 24 h después, se evaluaba la memoria a corto (MCP) o a largo plazo (MLP), respectivamente, en la que los animales exploraban un objeto familiar y otro novedoso. El índice de discriminación entre el objeto familiar y novedoso, fue menor para los ratones H2AX^{-/-}, tanto en la prueba de

4. RESULTADOS

MCP como en la MLP (**Fig. 16B**). Deficiencias similares se encontraron en la prueba de evitación pasiva (**Fig. 16C**), donde los ratones $H2AX^{-/-}$ presentaron una menor latencia de entrada al compartimento oscuro (expresado como número de veces la latencia del entrenamiento) en la MCP y la MLP evaluadas 1 o 72 h tras la sesión de entrenamiento, respectivamente.

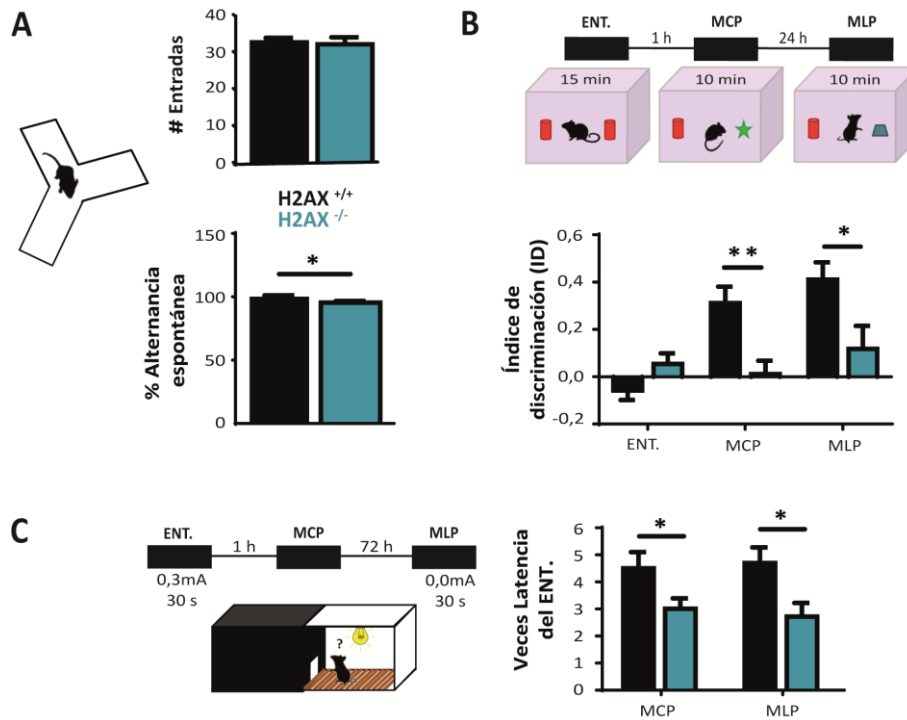


Figura 16. Los ratones $H2AX^{-/-}$ presentan alteraciones cognitivas. (A) Esquema representativo del laberinto en Y y cuantificación del número de entradas y el porcentaje de alternancia espontánea en una sesión de 8 min. $n=9$ y 10 para ratones $H2AX^{+/+}$ y $H2AX^{-/-}$, respectivamente. (B) Esquema representativo del protocolo de reconocimiento de objetos consistente en una sesión de entrenamiento de 15 min de duración, seguida de una sesión de evaluación de la MCP o de la MLP, 1 o 24 h tras el entrenamiento, respectivamente. Representación de los índices de discriminación obtenidos para cada una de las sesiones. $n=8$ ratones por genotipo. (C) Esquema representativo de la caja de evitación pasiva y del protocolo utilizado consistente en una sesión de entrenamiento, y dos sesiones para la evaluación de la MCP y de la MLP, 1 o 72 h tras el entrenamiento. Representación de la latencia de entrada en número de veces la latencia de entrada en el entrenamiento en la evaluación de la MCP y de la MLP. $n=11$ y 12 para ratones silvestres y $H2AX^{-/-}$, respectivamente. *representa diferencias significativas entre los genotipos en una misma sesión. $*p<0,05$; $**p<0,01$.

5. DISCUSIÓN

En los últimos años ha surgido la idea de que el genoma neuronal es un mosaico genético, pero cómo se genera y qué papel fisiológico tiene este mosaico aún es desconocido. Dos de los mecanismos que han sido postulados como posibles candidatos generadores de este mosaico genético neuronal, son la retrotransposición de LINE-1 (L1) y las reorganizaciones del ADN que ocurren de forma similar a las observadas en la recombinación V(D)J para la generación de las inmunoglobulinas. Se ha postulado que ambos procesos podrían participar en la generación de la diversidad neuronal que tiene lugar en el desarrollo (Muotri y Gage, 2006). Sin embargo, no se conoce si estos procesos ocurren en el cerebro adulto, ni el papel fisiológico que estas reorganizaciones pudieran tener. Ambos mecanismos necesitan de las maquinarias involucradas en la reparación de las roturas del ADN (Benedict y col., 2000; Schatz, 2004; Lieber y col., 2004; Yamaguchi y col., 2015). Recientemente se ha demostrado que la exploración de un nuevo entorno provoca roturas en el ADN neuronal durante cambios de actividad fisiológica cuya acumulación podría desencadenar alteraciones patológicas (Suberbielle y col., 2013 y 2015). En el desarrollo de esta tesis doctoral estudiamos la implicación de los mecanismos de las reorganizaciones genómicas en los procesos cognitivos.

En primer lugar realizamos un estudio de la retrotransposición de L1. Nuestros resultados mostraron que la activación neuronal provocada por la exposición a un nuevo entorno enriquecido (AR), causa un aumento en el número de inserciones de L1. Además, la inhibición de la retrotransposición de L1 mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (OASs), indicó que la formación de la memoria requiere de la inserción *de novo* de L1 en el hipocampo adulto. En cuanto al papel del metabolismo del ADN neuronal en los procesos cognitivos, observamos que la activación neuronal provocada por una sesión de exploración de un AR, induce la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo del ADN de forma transitoria y secuencial en el hipocampo y en la corteza prefrontal. Asimismo, la administración en el hipocampo de OASs específicos contra TDP1, TDP2 y H2AX, tres proteínas implicadas en procesos de reparación del ADN, disminuyó la formación de la memoria. Para finalizar, estudiamos el papel de la histona H2AX en la función del sistema nervioso usando el ratón mutante nulo. Nuestros resultados mostraron que la proteína H2AX podría estar involucrada en el correcto desarrollo del hipocampo y de la amígdala y por ende, alteró los patrones conductuales que denotan depresión, sociabilidad y cognición.

Estos datos en conjunto proporcionan evidencias de que las reorganizaciones del ADN neuronal en el cerebro adulto podrían ser necesarias para los procesos cognitivos. Además, los datos obtenidos con el ratón carente de H2AX indican que fallos en la detección de las roturas en el ADN neuronal podrían provocar alteraciones en la morfología cerebral y desencadenar alteraciones conductuales.

1. RETROTRANSPOSICIÓN DE LINE-1 EN EL SISTEMA NERVIOSO: MÁS ALLÁ DEL MOSAICO NEURONAL.

La retrotransposición de L1 ha sido postulada como un posible candidato de la generación del mosaico genómico cerebral durante el desarrollo del sistema nervioso central. Así, se cree que la consecuencia del mosaico sería formar neuronas con genomas únicos y, por ende, transcriptomas duraderos distintos que generarían la basta variedad de neuronas que existen en el cerebro (Erwin y col., 2014; Paquola y col., 2017). Sin embargo, poco se conoce de su papel en el cerebro adulto y si podría estar involucrada en los procesos cognitivos.

La consolidación de la memoria es un proceso que requiere inicialmente del hipocampo para posteriormente la información adquirida ser distribuida por diferentes áreas corticales donde se produce su almacenamiento (Frankland y Bontempi, 2005; Squire y col., 2015). Así, la consolidación de la memoria requiere del establecimiento, el mantenimiento y el reajuste de las redes neuronales específicas que fortalecen y forman las nuevas conexiones dentro de áreas específicas, involucradas en el aprendizaje y la memoria (Baranes y col., 1998; Maletic-Savatic y col., 1999; Toni y col., 1999; Goshen y col., 2011). Además, es necesaria la síntesis de nuevas proteínas (Davis y Squire, 1984; Inda y col., 2005; Harvey y Svoboda, 2007), que ocurre en dos oleadas temporales (Freeman y col., 1995, Quevedo y col., 1999, Igaz y col., 2002): en primer lugar, se requiere de la expresión de las proteínas efectoras codificadas por los genes tempranos inmediatos (del inglés, “Inmediate-Early-Genes”, IEGs) para la codificación del aprendizaje, junto con los factores de transcripción c-Fos y Egr1, entre otros. En segundo lugar, las proteínas implicadas en las vías de transducción de la señal, la transmisión sináptica y la comunicación celular (Benito y col., 2011; Lacar y col., 2016) son inducidas por los factores de transcripción codificados por los IEGs, para la formación de la memoria a largo plazo. Sin embargo, aún se desconoce cómo este programa genético transitorio es capaz de sostener los procesos duraderos asociados a la consolidación de la memoria.

Al inicio del siglo XXI Peña de Ortiz y Arshavsky (2001) sugirieron que la codificación de la memoria en el cerebro podría estar presente dentro de las neuronas cerebrales en forma de reorganizaciones del ADN neuronal que modificarían el transcriptoma neuronal. Por tanto, las reorganizaciones genómicas podrían ser necesarias como un mecanismo de generación de nuevas proteínas portadoras de las trazas de memoria.

Uno de los mecanismos que provoca reorganizaciones genómicas es la retrotransposición de L1. Nuestros resultados demostraron que la activación neuronal en condiciones fisiológicas provoca un aumento de las inserciones *de novo* de L1 en el hipocampo de ratones adultos. Un resultado que apoya la necesidad de la actividad eléctrica neuronal para que ocurra la activación de L1, lo proporcionó la ausencia de retrotranscripción cuando la exploración ocurre bajo la influencia de fármacos que bloquean la transmisión glutamatérgica.

Los procesos cognitivos requieren de cambios en la actividad eléctrica, especialmente de la transmisión glutamatérgica (Bellinger y col., 2002), lo que podría sugerir que L1 podría estar relacionado con estos procesos. Nosotros abordamos esta sugerencia realizando un bloqueo genético transitorio, por administración de OASs de ORF1 y ORF2, en el hipocampo de ratones sometidos al paradigma de evitación pasiva. Nuestros datos indican que la inserción *de novo* de L1 es necesaria solo para la formación de memorias duraderas y no para el aprendizaje. Estos resultados apoyarían que las inserciones *de novo* de L1 que ocurren en el cerebro adulto tras actividad neuronal podrían contribuir a la formación de la memoria generando neuronas con genomas únicos y, consecuentemente, con transcriptomas duraderos distintos debidos a alteraciones en la expresión génica, al ajustamiento del ARN y/o provocando la poliadenilación prematura del ARN (Erwin y col., 2014). Recientemente, la secuenciación de célula única, ha permitido identificar las inserciones de L1 en las neuronas hipocampales humanas, ocurriendo ésta con mayor frecuencia en genes activos en el hipocampo que se encuentran relacionados con diferentes procesos sinápticos (Upton y col., 2015). Esto sugiere que la retrotransposición de L1 podría afectar a los procesos sinápticos que tienen lugar en el hipocampo durante los procesos de plasticidad sináptica que ocurren en los procesos cognitivos.

Por tanto, nuestros datos en conjunto sugieren que combinaciones de inserciones de L1 en neuronas individuales del cerebro adulto, podrían contribuir al almacenamiento de la memoria a largo plazo.

2. METABOLISMO DEL ADN Y SU IMPLICACIÓN EN LOS PROCESOS COGNITIVOS.

Recientemente, se ha descrito que la exploración de un nuevo entorno provoca roturas transitorias en el ADN neuronal (Suberbielle y col., 2013). En base a esto, quisimos conocer el papel del metabolismo del ADN en los procesos dependientes de activación neuronal, entre ellos los procesos cognitivos. Para que se produzca el almacenamiento duradero de la información debe de ocurrir un proceso de consolidación, que se inicia con la codificación de la información en el hipocampo y posteriormente con el almacenamiento en áreas corticales (Dudai, 1996 y 2004; Frankland y Bontempi, 2005). En este contexto, nuestros resultados muestran que la actividad eléctrica inducida por una sesión de exploración provoca un aumento secuencial de las roturas en el ADN, marcados como focos de inmunreactividad de la proteína 53BP1, en el hipocampo y en la corteza prefrontal. Además, la expresión de genes relacionados con la reparación del ADN aumenta en paralelo con las roturas del ADN en ambas áreas del cerebro. Numerosos estudios han descrito que ciertos factores de recombinación y reparación del ADN, como TdT, la ADN ligasa, Fen1 y, más recientemente RAG1 (Peña de Ortiz y col., 2003; Colón-Cesario y col., 2006; Saavedra-Rodríguez y col., 2009; Castro-Pérez y col., 2016) se inducen en el hipocampo y/o en la amígdala de ratones tras la exposición a una sesión de aprendizaje de miedo al contexto. Además, un incremento rápido en la actividad de recombinación en el hipocampo ha sido descrito tras el entrenamiento de un

condicionamiento por miedo al contexto (Colón-Cesario y col., 2006) y de forma secuencial en el hipocampo y en la corteza prefrontal, tras la exploración de un AR (datos no publicados del laboratorio). Todos estos resultados en su conjunto sugieren que la rotura y reparación del ADN podrían estar relacionadas con los procesos cognitivos.

Para estudiar el papel funcional del metabolismo del ADN en los procesos cognitivos, estudios previos del grupo de Peña de Ortiz (Colón-Cesario y col., 2006) mostraron que la inhibición del metabolismo del ADN administrando araC, un inhibidor del metabolismo del ADN, bloqueó la formación de memorias de miedo al contexto. Igualmente, experimentos similares de nuestro laboratorio inyectando araC a distintos tiempos y en distintas áreas cerebrales, demostraron la implicación secuencial del metabolismo del ADN en el hipocampo y la corteza prefrontal en la consolidación de memorias del reconocimiento de objetos nuevos (resultados en preparación). Nuestros estudios de bloqueo genético transitorio por administración de OASs contra TDP1, TDP2 y H2AX (tres proteínas implicadas en la reparación del ADN) en el hipocampo de ratones, también muestran que estas proteínas son necesarias para la formación de memorias en el test de evitación pasiva. Así pues, todos estos resultados indican el posible papel de los procesos implicados en el metabolismo del ADN en la formación de memorias duraderas.

El término de metabolismo del ADN incluye multitud de procesos, desde la síntesis, transcripción, recombinación y reparación del ADN. En todos estos procesos un punto clave, de una forma u otra, es la rotura del ADN. Múltiples estudios demuestran que los cambios transcripcionales son necesarios para la formación de memoria (Abraham y col., 1991; Alberini, 2005). Incluso más recientemente, se ha publicado que las roturas del ADN tras una estimulación eléctrica neuronal podrían formar parte o facilitar el remodelado cromatínico necesario para la transcripción de los IEGs relacionados con procesos de plasticidad neuronal (Madabhushi y col., 2015). Sin embargo, tras la corroboración de que el cerebro es un mosaico genético que se genera durante el desarrollo y que puede evolucionar en la vida adulta por eventos de actividad sináptica (inserciones de L1) no se puede descartar que la formación de nuevos genomas, por retrotransposición o incluso por procesos de recombinación dirigida, y por ende nuevos transcriptomas, estén relacionados con el almacenamiento duradero de información en el cerebro. Estudios futuros deberán corroborar o descartar si la recombinación somática neuronal pudiera ser un mecanismo molecular necesario para el almacenamiento duradero de recuerdos.

3. ESTUDIO DEL MUTANTE NULO PARA H2AX.

El mantenimiento de la integridad genómica en el sistema nervioso es esencial para el buen funcionamiento de éste (Barzilai, 2013; McKinnon, 2013; Madabhushi y col., 2014; Enriquez-Rios y col., 2017). La relación que existe entre la acumulación de las roturas en el ADN, los fallos en el sistema de reparación de éstas y cómo esto afecta al desarrollo o el mantenimiento

del sistema nervioso ha sido ampliamente estudiado gracias al uso de ratones modificados genéticamente (Frappart y McKinnon, 2008; Jeppesen y col., 2011) para genes que codifican para proteínas relacionadas con los procesos de recombinación y reparación del ADN (Gowen y col., 1996; Frappart y col., 2007; Gu y col., 2000; Barnes y col., 1998; Xiao y Weaver, 1997; Luo y col., 1999; Zhu y col., 2001; Barlow y col., 1996; Brown y Baltimore, 2000). Una prueba de la importancia de las vías de señalización y resolución de las roturas del ADN en el desarrollo del organismo, viene demostrado por la escasa viabilidad o el crecimiento retardado que presentan los ratones KO para la mayoría de estos genes (Barlow y col., 1996; Nussenzweig y col., 1996; Gu y col., 1997; Frank y col., 1998; Gao y col., 1999; Zhu y col., 2001).

Nosotros hemos caracterizado el ratón mutante nulo para H2AX, un sensor proteico de roturas de doble cadena en el ADN. Estos animales presentan un menor tamaño que los silvestres, en consonancia con lo descrito en los otros mutantes nulos para genes que codifican proteínas relacionadas con los procesos de roturas y reparación del ADN. Sin embargo, al contrario que para los mencionados modelos, el ratón H2AX^{-/-} vive hasta edades avanzadas (hasta 18 meses) (Celeste y col., 2003), por lo que suponen una gran ventaja para el estudio del papel de las roturas y reparaciones del ADN en el cerebro adulto.

La reparación del ADN es un proceso importante en el desarrollo del sistema nervioso, ya que lesiones en esta molécula o mutaciones no reparadas durante el desarrollo, pueden tener grandes efectos en la formación del sistema nervioso (McKinnon, 2013). De hecho, la delección de genes que codifican para proteínas implicadas en reparación del ADN en la línea germinal claramente ilustra este punto (van der Horst y col., 1997; Murai y col., 2001; Laposa y col., 2007; Katya y col., 2007). El análisis histológico del cerebro de ratones adultos carentes de H2AX mostró alteraciones en el hipocampo, especialmente en el giro dentado y en la amígdala. Alteraciones en estas áreas han sido relacionadas con las patologías de depresión y sociabilidad (Hickie y col., 2005; Burke y col., 2011). De hecho, el ratón mutante para H2AX presenta alteradas estas conductas.

La amígdala ha sido relacionada con el aprendizaje que requiere de un componente emocional (LaLumiere y col., 2017), con el aprendizaje social (Adolphs, 2010) y con la depresión (Leal y col., 2017). Un aumento en el tamaño de la amígdala ha sido descrito en autismo y en concreto, se asocia a los problemas de comunicación y de interacción social que aparecen en estos pacientes (Schumann y col., 2009). Además de la amígdala, la conducta social implica la activación de varias regiones cerebrales, incluyendo el hipocampo y la corteza prefrontal (Kim y col., 2015). Estas áreas modulan los circuitos neuronales (Strange y col., 2014), por lo tanto, quisimos conocer si los ratones H2AX^{-/-} presentaban alteraciones en la conectividad sináptica de estas áreas. El análisis del balance sináptico de excitación/inhibición reveló un incremento en este parámetro en el *stratum radiatum* de CA1 en los ratones mutantes. Recientemente se ha descrito la implicación de las neuronas de CA1 en la codificación de la memoria social (Okuyama y col., 2016), por lo que el desbalance sináptico en

esta zona, acompañado de un mayor tamaño de la amígdala, podrían explicar las alteraciones que presentan los ratones H2AX^{-/-} en la interacción social.

Asimismo, cambios de los volúmenes del hipocampo y la amígdala han sido descritos en pacientes de depresión: en concreto un aumento de la amígdala (Burke y col., 2011) y una disminución en el volumen hipocampal (Hickie y col., 2005). Como los ratones H2AX^{-/-} mostraron alteraciones en estas estructuras, fueron sometidos a dos pruebas diseñadas para detectar depresión: el test del nado forzado y la preferencia a sacarosa, como indicador de anhedonia (Petit-Demouliere y col., 2005; Barkus, 2013; Bogdanova y col., 2013; Hales y col., 2014). En ambas pruebas, los ratones mutantes presentaron una clara conducta depresiva con respecto a los ratones silvestres, sugiriendo que las alteraciones en la morfología cerebral podrían estar implicadas en el desarrollo de la depresión.

En cuanto a los aspectos cognitivos, nuestros resultados previos del análisis de la expresión génica de h2ax tras un protocolo de activación neuronal, además del estudio de la inhibición genética transitoria con un OAS en el hipocampo, mostraron que H2AX está implicada en la formación de la memoria a largo plazo. Sin embargo, el ratón H2AX^{-/-} mostró alteraciones en el aprendizaje y/o la formación de la memoria en distintas pruebas conductuales. Estas alteraciones cognitivas, al ser diferentes a las encontradas en los ratones administrados con el OAS para H2AX, podrían estar relacionadas con las alteraciones encontradas en la amígdala y el hipocampo como consecuencia de la ausencia de H2AX durante el desarrollo, más que a la ausencia de esta proteína en el cerebro adulto.

En conjunto, estos datos ponen de manifiesto la importancia de una correcta señalización de las roturas del ADN para mantener la citoarquitectura y funcionalidad del sistema nervioso. Estudios más detallados que abarquen diferente rango de edades, podrían esclarecer si las alteraciones observadas en los ratones H2AX^{-/-} se deben a problemas en el desarrollo del sistema nervioso, al igual que ocurren en otros modelos de reparaciones y roturas del ADN (revisión en Frappart y McKinnon, 2008).

6. CONCLUSIONS

1. The neuronal activation induced by the exploration of a new enriched environment provokes *de novo* L1 insertions in the adult hippocampus.
2. L1 retrotransposition is necessary to aversive memory formation processes without interference on learning processes.
3. Neuronal activity provoked by novel exploration induced sequential DNA damage in hippocampus and prefrontal cortex.
4. A novel exploration induces two waves of DNA metabolism-related genes transcription: an early hippocampal-dependent phase and a late prefrontal cortex-dependent one.
5. Local and transient hippocampal oligonucleotide antisense inhibition of TDP1, TDP2 y H2AX, three proteins related with DNA repair process, impair long-term memory formation in the passive avoidance test.
6. The lack of H2AX histone causes abnormal hippocampal and amygdale morphology.
7. The lack of H2AX histone provokes neurological and cognitive deficiencies, including depression, social interaction alteration and impairment learning and memory processes.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham, W. C., Dragunow, M., y Tate, W. P. (1991). The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. *Mol Neurobiol* 5, 297-314.

Adolphs, R. (2010). What does the amygdala contribute to social cognition? *Ann N Y Acad Sci* 1191, 42-61.

Aguilera, A. y Gaillard, H. (2014). Transcription and recombination: When RNA meets DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6:a016543.

Aguilera, A. y Garcia-Muse, T. (2013). Causes of genome instability. *Annu Rev Genet* 47, 1-32.

Alberini, C.M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28, 51-56.

Alberini, C.M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89, 121-145.

Anttinen, A., Koulu, L., Nikoskelainen, E., Portin, R., Kurki, T., Erkinjuntti, M., Jaspers, N. G., Raams, A., Green, M. H., Lehmann, A. R., y col. (2008). Neurological symptoms and natural course of xeroderma pigmentosum. *Brain* 131, 1979-1989.

Arkhipova, I. R. y Meselson, M. (2005). Diverse DNA transposons in rotifers of the class Bdelloidea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11781-11786.

Baranes, D., Lederfein, D., Huang, Y. Y., Chen, M., Bailey, C. H. y Kandel, E. R. (1998). Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21, 813-825.

Barkus, C. (2013). Genetic mouse models of depression. *Curr Top Behav Neurosci* 14, 55-78.

Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J. N., Ried, T., Tagle, D. y Wynshaw-Boris, A. (1996). Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86, 159-171.

Barlow, D. P. (1993). Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation? *Science* 260, 309-310.

Barnes, D. E., Stamp, G., Rosewell, I., Denzel, A. y Lindahl, T. (1998). Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Curr Biol* 8, 1395-1398.

Barzilai, A. y McKinnon, P. J. (2013). Genome maintenance in the nervous system; insight into the role of the DNA damage response in brain development and disease. *DNA Repair (Amst)* 12, 541-542.

Beauregard, A., Curcio, M. J. y Belfort, M. (2008). The take and give between retrotransposable elements and their hosts. *Annu Rev Genet* 42, 587-617.

Beck, C. R., Garcia-Perez, J. L., Badge, R. M. y Moran, J. V. (2011). LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 12, 187-215.

Bedrosian, T. A., Linker, S. y Gage, F. H. (2016). Environment-driven somatic mosaicism in brain disorders. *Genome Med* 8, 58.

Bekker-Jensen, S., Rendtlew Danielsen, J., Fugger, K., Gromova, I., Nerstedt, A., Lukas, C., Bartek, J., Lukas, J. y Mailand, N. (2010). HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. *Nat Cell Biol* 12, 80-86; sup pp 81-12.

Belgnaoui, S. M., Gosden, R. G., Semmes, O. J. y Haoudi, A. (2006). Human LINE-1 retrotransposon induces DNA damage and apoptosis in cancer cells. *Cancer Cell Int* 6, 13.

Bellinger, F. P., Wilce, P. A., Bedi, K. S., y Wilson, P. (2002). Long-lasting synaptic modification in the rat hippocampus resulting from NMDA receptor blockade during development. *Synapse* 43, 95-101.

Benedict, C. L., Gilfillan, S., Thai, T. H. y Kearney, J. F. (2000). Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. *Immunol Rev* 175, 150-157.

Benit, L., Lallemand, J. B., Casella, J. F., Philippe, H. y Heidmann, T. (1999). ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals. *J Virol* 73, 3301-3308.

Benito, E., Valor, L. M., Jimenez-Minchan, M., Huber, W. y Barco, A. (2011). cAMP response element-binding protein is a primary hub of activity-driven neuronal gene expression. *J Neurosci* 31, 18237-18250.

Biemont, C. (2009). Are transposable elements simply silenced or are they under house arrest? *Trends Genet* 25, 333-334.

Bogdanova, O. V., Kanekar, S., D'Anci, K. E. y Renshaw, P. F. (2013). Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav* 118, 227-239.

Borgesius, N. Z., de Waard, M. C., van der Pluijm, I., Omrani, A., Zondag, G. C., van der Horst, G. T., Melton, D. W., Hoeijmakers, J. H., Jaarsma, D. y Elgersma, Y. (2011). Accelerated age-related cognitive decline and neurodegeneration, caused by deficient DNA repair. *J Neurosci* 31, 12543-12553.

Botuyan, M. V., Lee, J., Ward, I. M., Kim, J. E., Thompson, J. R., Chen, J. y Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127, 1361-1373.

Bourc'his, D. y Bestor, T. H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431, 96-99.

Brown, E. J. y Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* 14, 397-402.

Bundo, M., Toyoshima, M., Okada, Y., Akamatsu, W., Ueda, J., Nemoto-Miyauchi, T., Sunaga, F., Toritsuka, M., Ikawa, D., Kakita, A., y col. (2014). Increased I1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron* 81, 306-313.

Bunting, S. F. y Nussenzweig, A. (2013). End-joining, translocations and cancer. *Nat Rev Cancer* 13, 443-454.

Burke, J., McQuoid, D. R., Payne, M. E., Steffens, D. C., Krishnan, R. R. y Taylor, W. D. (2011). Amygdala volume in late-life depression: relationship with age of onset. *Am J Geriatr Psychiatry* 19, 771-776.

Bushman, D. M. y Chun, J. (2013). The genomically mosaic brain: aneuploidy and more in neural diversity and disease. *Semin Cell Dev Biol* 24, 357-369.

Caldecott, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* 9, 619-631.

Castro-Perez, E., Soto-Soto, E., Perez-Carambot, M., Dionisio-Santos, D., Saied-Santiago, K., Ortiz-Zuazaga, H. G. y Pena de Ortiz, S. (2016). Identification and Characterization of the V(D)J Recombination Activating Gene 1 in Long-Term Memory of Context Fear Conditioning. *Neural Plast* 2016, 1752176.

Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., Pilch, D. R., Staudt, D. W., Lee, A., Bonner, R. F., Bonner, W. M. y Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5, 675-679.

Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M. J., y col. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922-927.

Chapman, J. R., Taylor, M. R. y Boulton, S. J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 47, 497-510.

Chen, J. y Stubbe, J. (2005). Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5, 102-112.

Chun, J. J., Schatz, D. G., Oettinger, M. A., Jaenisch, R. y Baltimore, D. (1991). The recombination activating gene-1 (RAG-1) transcript is present in the murine central nervous system. *Cell* 64, 189-200.

Ciaudo, C., Jay, F., Okamoto, I., Chen, C. J., Sarazin, A., Servant, N., Barillot, E., Heard, E. y Voinnet, O. (2013). RNAi-dependent and independent control of LINE1 accumulation and mobility in mouse embryonic stem cells. *PLoS Genet* 9, e1003791.

Ciccia, A. y Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40, 179-204.

Clegg, M. T. y Durbin, M. L. (2003). Tracing floral adaptations from ecology to molecules. *Nat Rev Genet* 4, 206-215.

Cohen, C. J., Lock, W. M. y Mager, D. L. (2009). Endogenous retroviral LTRs as promoters for human genes: a critical assessment. *Gene* 448, 105-114.

Colon-Cesario, M., Wang, J., Ramos, X., Garcia, H. G., Davila, J. J., Laguna, J., Rosado, C. y Pena de Ortiz, S. (2006). An inhibitor of DNA recombination blocks memory consolidation, but not reconsolidation, in context fear conditioning. *J Neurosci* 26, 5524-5533.

Cooper, G. y Hausman, R. (2014). *The cell: a Molecular Approach*, 6th Edition, Sinauer Associates. ISBN: 978-0763739058.

Couedel, C., Mills, K. D., Barchi, M., Shen, L., Olshen, A., Johnson, R. D., Nussenzweig, A., Essers, J., Kanaar, R., Li, G. C., y col. (2004). Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells. *Genes Dev* 18, 1293-1304.

Coufal, N. G., Garcia-Perez, J. L., Peng, G. E., Yeo, G. W., Mu, Y., Lovci, M. T., Morell, M., O'Shea, K. S., Moran, J. V. y Gage, F. H. (2009). L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* 460, 1127-1131.

Cowell, I. G., Sunter, N. J., Singh, P. B., Austin, C. A., Durkacz, B. W. y Tilby, M. J. (2007). gammaH2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. *PLoS One* 2, e1057.

Craig, N., Craigie, R., Gellert, M. y Lambowitz, A. (2002). Mobile DNA II. Paper presented at: ASM (Washington DC).

Curtin, N. J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 12, 801-817.

Davis, A. J., Chen, B. P. y Chen, D. J. (2014). DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair (Amst)* 17, 21-29.

Davis, H. P. y Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96, 518-559.

Dejardin, J. (2012). How chromatin prevents genomic rearrangements: locus colocalization induced by transcription factor binding. *Bioessays* 34, 90-93.

Dennis, E. S. y Brettell, R. I. (1990). DNA methylation of maize transposable elements is correlated with activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 326, 217-229.

Deriano, L. y Roth, D. B. (2013). Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu Rev Genet* 47, 433-455.

Difilippantonio, S., Gapud, E., Wong, N., Huang, C. Y., Mahowald, G., Chen, H. T., Kruhlak, M. J., Callen, E., Livak, F., Nussenzweig, M. C., y col. (2008). 53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination. *Nature* 456, 529-533.

Dimitri, P., Arca, B., Berghella, L. y Mei, E. (1997). High genetic instability of heterochromatin after transposition of the LINE-like I factor in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8052-8057.

Dimitrova, N., Chen, Y. C., Spector, D. L. y de Lange, T. (2008). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* 456, 524-528.

Ding, S., Wu, X., Li, G., Han, M., Zhuang, Y. y Xu, T. (2005). Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* 122, 473-483.

Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D. H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., y col. (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin

conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* 136, 435-446.

Downs, J. A. y Jackson, S. P. (2004). A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 367-378.

Downs, J. A., Lowndes, N. F. y Jackson, S. P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408, 1001-1004.

Dudai, Y. (1996). Consolidation: fragility on the road to the engram. *Neuron* 17, 367-370.

Dudai, Y. (1994). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?. *Annu Rev Psychol* 55, 51-86.

Dudley, D. D., Chaudhuri, J., Bassing, C. H. y Alt, F. W. (2005). Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol* 86, 43-112.

Enriquez-Rios, V., Dumitrache, L. C., Downing, S. M., Li, Y., Brown, E. J., Russell, H. R. y McKinnon, P. J. (2017). DNA-PKcs, ATM, and ATR Interplay Maintains Genome Integrity during Neurogenesis. *J Neurosci* 37, 893-905.

Erwin, J. A., Marchetto, M. C. y Gage, F. H. (2014). Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nat Rev Neurosci* 15, 497-506.

Erwin, J. A., Paquola, A. C., Singer, T., Gallina, I., Novotny, M., Quayle, C., Bedrosian, T. A., Alves, F. I., Butcher, C. R., Herdy, J. R., y col. (2016). L1-associated genomic regions are deleted in somatic cells of the healthy human brain. *Nat Neurosci* 19, 1583-1591.

Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C., y Yáñez, E. (2010). *Bioquímica Conceptos Esenciales*. 2nd Edition, Panamericana, ISBN: 9788498358759.

Feng, L. y Chen, J. (2012). The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair. *Nat Struct Mol Biol* 19, 201-206.

Frank, K. M., Sekiguchi, J. M., Seidl, K. J., Swat, W., Rathbun, G. A., Cheng, H. L., Davidson, L., Kangaloo, L. y Alt, F. W. (1998). Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature* 396, 173-177.

Frankland, P. W. y Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6, 119-130.

Frappart, P. O., Lee, Y., Lamont, J. y McKinnon, P. J. (2007). BRCA2 is required for neurogenesis and suppression of medulloblastoma. *Embo J* 26, 2732-2742.

Frappart, P. O. y McKinnon, P. J. (2008). Mouse models of DNA double-strand break repair and neurological disease. *DNA Repair (Amst)* 7, 1051-1060.

Freeman, F. M., Rose, S. P. y Scholey, A. B. (1995). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem* 63, 291-295.

Gao, Y., Sun, Y., Frank, K. M., Dikkes, P., Fujiwara, Y., Seidl, K. J., Sekiguchi, J. M., Rathbun, G. A., Swat, W., Wang, J., y col. (1998). A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell* 95, 891-902.

Gasior, S. L., Roy-Engel, A. M. y Deininger, P. L. (2008). ERCC1/XPF limits L1 retrotransposition. *DNA Repair (Amst)* 7, 983-989.

Gasior, S. L., Wakeman, T. P., Xu, B. y Deininger, P. L. (2006). The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *J Mol Biol* 357, 1383-1393.

Gelot, C., Le-Guen, T., Ragu, S. y Lopez, B. (2016). Double-Strand Break Repair: Homologous Recombination in Mammals Cells. Pertenece al libro: Kovalchuk, I. y Kovalchuk, O. (2016). *Genome Stability*, (337-351), Acad Press, Elsevier, ISBN: 978-0-12-803309-8.

Gilfillan, S., Benoist, C. y Mathis, D. (1995). Mice lacking terminal deoxynucleotidyl transferase: adult mice with a fetal antigen receptor repertoire. *Immunol Rev* 148, 201-219.

Gomez, V. y Hergovich, A. (2016). Cell-cycle control and DNA-Damage signalling in mammals. Pertenece al libro: Kovalchuk, I. y Kovalchuk, O. (2016). *Genome Stability*, (227-242), Acad Press, Elsevier, ISBN: 978-0-12-803309-8.

Gomez-Herreros, F., Romero-Granados, R., Zeng, Z., Alvarez-Quilon, A., Quintero, C., Ju, L., Umans, L., Vermeire, L., Huylebroeck, D., Caldecott, K. W. y Cortes-Ledesma, F. (2013). TDP2-dependent non-homologous end-joining protects against topoisomerase II-induced DNA breaks and genome instability in cells and in vivo. *PLoS Genet* 9, e1003226.

Goodarzi, A. A. y Jeggo, P. A. (2013). The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Adv Genet* 82, 1-45.

Goodarzi, A. A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S. A., Ye, R., Harer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P. A. y Lees-Miller, S. P. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *Embo J* 25, 3880-3889.

Goshen, I., Brodsky, M., Prakash, R., Wallace, J., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C. y Deisseroth, K. (2011). Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell* 147, 678-689.

Gowen, L. C., Johnson, B. L., Latour, A. M., Sulik, K. K. y Koller, B. H. (1996). Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet* 12, 191-194.

Gravel, S., Chapman, J. R., Magill, C. y Jackson, S. P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev* 22, 2767-2772.

Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M. F. y Lieber, M. R. (2007). XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *Embo J* 26, 1010-1023.

Gu, Y., Seidl, K. J., Rathbun, G. A., Zhu, C., Manis, J. P., van der Stoep, N., Davidson, L., Cheng, H. L., Sekiguchi, J. M., Frank, K., y col. (1997). Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity* 7, 653-665.

Gu, Y., Sekiguchi, J., Gao, Y., Dikkes, P., Frank, K., Ferguson, D., Hasty, P., Chun, J. y Alt, F. W. (2000). Defective embryonic neurogenesis in Ku-deficient but not DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2668-2673.

Guirouilh-Barbat, J., Lambert, S., Bertrand, P. y Lopez, B. S. (2014). Is homologous recombination really an error-free process? *Front Genet* 5, 175.

Guzowski, J. F., Timlin, J. A., Roysam, B., McNaughton, B. L., Worley, P. F. y Barnes, C. A. (2005). Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Curr Opin Neurobiol* 15, 599-606.

Hackett, P. B., Largaespada, D. A. y Cooper, L. J. (2010). A transposon and transposase system for human application. *Mol Ther* 18, 674-683.

Hales, C. A., Stuart, S. A., yerson, M. H. y Robinson, E. S. (2014). Modelling cognitive affective biases in major depressive disorder using rodents. *Br J Pharmacol* 171, 4524-4538.

Hartley, K. O., Gell, D., Smith, G. C., Zhang, H., Divecha, N., Connelly, M. A., Admon, A., Lees-Miller, S. P., Anderson, C. W. y Jackson, S. P. (1995). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell* 82, 849-856.

Harvey, C. D. y Svoboda, K. (2007). Locally dynamic synaptic learning rules in pyramidal neuron dendrites. *Nature* 450, 1195-1200.

Hedges, D. J. y Deininger, P. L. (2007). Inviting instability: Transposable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity. *Mutat Res* 616, 46-59.

Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B. y Sharma, R. A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 193-204.

Herrup, K., Chen, J. y Li, J. (2013). Breaking news: thinking may be bad for DNA. *Nat Neurosci* 16, 518-519.

Hickie, I., Naismith, S., Ward, P. B., Turner, K., Scott, E., Mitchell, P., Wilhelm, K. y Parker, G. (2005). Reduced hippocampal volumes and memory loss in patients with early- and late-onset depression. *Br J Psychiatry* 186, 197-202.

Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361, 1475-1485.

Huang, E., Qu, D., Zhang, Y., Venderova, K., Haque, M. E., Rousseaux, M. W., Slack, R. S., Woulfe, J. M. y Park, D. S. (2010). The role of Cdk5-mediated apurinic/aprimidinic endonuclease 1 phosphorylation in neuronal death. *Nat Cell Biol* 12, 563-571.

Hunter, R. G., Murakami, G., Dewell, S., Seligsohn, M., Baker, M. E., Datson, N. A., McEwen, B. S. y Pfaff, D. W. (2012). Acute stress and hippocampal histone H3 lysine 9 trimethylation, a retrotransposon silencing response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 17657-17662.

Igaz, L. M., Vianna, M. R., Medina, J. H. y Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* 22, 6781-6789.

Ikeda, R., Kokubu, C., Yusa, K., Keng, V. W., Horie, K. y Takeda, J. (2007). Sleeping beauty transposase has an affinity for heterochromatin conformation. *Mol Cell Biol* 27, 1665-1676.

Inda, M. C., Delgado-Garcia, J. M. y Carrion, A. M. (2005). Acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of eyelid conditioning responses require de novo protein synthesis. *J Neurosci* 25, 2070-2080.

Ip, S. C., Rass, U., Blanco, M. G., Flynn, H. R., Skehel, J. M. y West, S. C. (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* 456, 357-361.

Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H. y Izsvak, Z. (1997). Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 91, 501-510.

Ivics, Z., Li, M. A., Mates, L., Boeke, J. D., Nagy, A., Bradley, A. y Izsvak, Z. (2009). Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat Methods* 6, 415-422.

Jackson, S. P. y Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078.

Jeggo, P. A., Taccioli, G. E. y Jackson, S. P. (1995). Menage a trois: double strand break repair, V(D)J recombination and DNA-PK. *Bioessays* 17, 949-957.

Jeppesen, D. K., Bohr, V. A. y Stevnsner, T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 94, 166-200.

Jette, N. y Lees-Miller, S. P. (2015). The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Prog Biophys Mol Biol* 117, 194-205.

Jhappan, C., Morse, H. C., 3rd, Fleischmann, R. D., Gottesman, M. M. y Merlino, G. (1997). DNA-PKcs: a T-cell tumour suppressor encoded at the mouse scid locus. *Nat Genet* 17, 483-486.

Jin, B., Li, Y. y Robertson, K. D. (2011). DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer* 2, 607-617.

Johnson, R. D. y Jasin, M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Embo J* 19, 3398-3407.

Jordan, E., Saedler, H. y Starlinger, P. (1968). O₀ and strong-polar mutations in the gal operon are insertions. *Mol Gen Genet* 102, 353-363.

Kapitonov, V. V. y Jurka, J. (2005). RAG1 core and V(D)J recombination signal sequences were derived from Transib transposons. *PLoS Biol* 3, e181.

Katyal, S., el-Khamisy, S. F., Russell, H. R., Li, Y., Ju, L., Caldecott, K. W., y McKinnon, P. J. (2007). TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair in neurons and is neuroprotective in vivo. *Embo J* 26, 4720-4731.

Kass, E. M. y Jasin, M. (2010). Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett* 584, 3703-3708.

Kazazian, H. H., Jr. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626-1632.

Kazazian, H. H., Jr., Wong, C., Youssoufian, H., Scott, A. F., Phillips, D. G. y Antonarakis, S. E. (1988). Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* 332, 164-166.

Keeney, S. (2008). Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. *Genome Dyn Stab* 2, 81-123.

Keeney, S. y Neale, M. J. (2006). Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans* 34, 523-525.

Kidwell, M. G. (1994). The Wilhelmine E. Key 1991 Invitational Lecture. The evolutionary history of the P family of transposable elements. *J Hered* 85, 339-346.

Kidwell, M. G. y Lisch, D. R. (2001). Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* 55, 1-24.

Kim, Y., Venkataraju, K. U., Pradhan, K., Mende, C., Taranda, J., Turaga, S. C., Arganda-Carreras, I., Ng, L., Hawrylycz, M. J., Rockland, K. S., y col. (2015). Mapping social behavior-induced brain activation at cellular resolution in the mouse. *Cell Rep* 10, 292-305.

Kinner, A., Wu, W., Staudt, C. y Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 36, 5678-5694.

Kleckner, N. (1990). Regulation of transposition in bacteria. *Annu Rev Cell Biol* 6, 297-327.

Kolas, N. K., Chapman, J. R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F. D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T. M., y col. (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* 318, 1637-1640.

Koster, D. A., Palle, K., Bot, E. S., Bjornsti, M. A. y Dekker, N. H. (2007). Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature* 448, 213-217.

Kovalchuk, I. (2016). *Genome Stability: An Evolutionary Perspective*. Pertenece al libro: Kovalchuk, I. y Kovalchuk, O. (2016). *Genome Stability*, (1-18), Acad Press, Elsevier, ISBN: 978-0-12-803309-8.

Kuff, E. L. y Lueders, K. K. (1988). The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects. *Adv Cancer Res* 51, 183-276.

Lacar, B., Linker, S. B., Jaeger, B. N., Krishnaswami, S., Barron, J., Kelder, M., Parylak, S., Paquola, A., Venepally, P., Novotny, M., y col. (2016). Nuclear RNA-seq of single neurons reveals molecular signatures of activation. *Nat Commun* 7, 11022.

LaLumiere, R. T., McGaugh, J. L. y McIntyre, C. K. (2017). Emotional Modulation of Learning and Memory: Pharmacological Implications. *Pharmacol Rev* 69, 236-255.

Lam, I. y Keeney, S. (2014). Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7:a016634.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., y col. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

Laposa, R. R., Huang, E. J., y Cleaver, J. E. (2007). Increased apoptosis, p53 up-regulation, and cerebellar neuronal degeneration in repair-deficient Cockayne syndrome mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1389-1394.

Lavin, M. F. (2007). ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26, 7749-7758.

Lavin, M. F. (2008). Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 759-769.

Lazarow, K., Doll, M. L. y Kunze, R. (2013). Molecular biology of maize Ac/Ds elements: an overview. *Methods Mol Biol* 1057, 59-82.

Leal, S. L., Noche, J. A., Murray, E. A. y Yassa, M. A. (2017). Disruption of amygdala-entorhinal-hippocampal network in late-life depression. *Hippocampus* 27, 464-476.

Lee, J. H. y Paull, T. T. (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26, 7741-7748.

Lee, Y. y McKinnon, P. J. (2007). Responding to DNA double strand breaks in the nervous system. *Neuroscience* 145, 1365-1374.

Lerman, D. N. y Feder, M. E. (2005). Naturally occurring transposable elements disrupt hsp70 promoter function in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* 22, 776-783.

Li, G., Alt, F. W., Cheng, H. L., Brush, J. W., Goff, P. H., Murphy, M. M., Franco, S., Zhang, Y. y Zha, S. (2008). Lymphocyte-specific compensation for XLF/cernunnos end-joining functions in V(D)J recombination. *Mol Cell* 31, 631-640.

Li, H., Vogel, H., Holcomb, V. B., Gu, Y. y Hasty, P. (2007). Deletion of Ku70, Ku80, or both causes early aging without substantially increased cancer. *Mol Cell Biol* 27, 8205-8214.

Li, J., Kannan, M., Trivett, A. L., Liao, H., Wu, X., Akagi, K. y Symer, D. E. (2014). An antisense promoter in mouse L1 retrotransposon open reading frame-1 initiates expression of diverse fusion transcripts and limits retrotransposition. *Nucleic Acids Res* 42, 4546-4562.

Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 283, 1-5.

Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 79, 181-211.

Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. y Schwarz, K. (2004). The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)* 3, 817-826.

Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.

Lindahl, T. y Barnes, D. E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65, 127-133.

Liu, H., Herrmann, C. H., Chiang, K., Sung, T. L., Moon, S. H., Donehower, L. A. y Rice, A. P. (2010). 55K isoform of CDK9 associates with Ku70 and is involved in DNA repair. *Biochem Biophys Res Commun* 397, 245-250.

Lodato, M. A., Woodworth, M. B., Lee, S., Evrony, G. D., Mehta, B. K., Karger, A., Lee, S., Chittenden, T. W., D'Gama, A. M., Cai, X., y col. (2015). Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. *Science* 350, 94-98.

Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M. A., Celeste, A., Manis, J. P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T. T., y col. (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* 21, 187-200.

Lu, H., Shimazaki, N., Raval, P., Gu, J., Watanabe, G., Schwarz, K., Swanson, P. C. y Lieber, M. R. (2008). A biochemically defined system for coding joint formation in V(D)J recombination. *Mol Cell* 31, 485-497.

Lukas, J., Lukas, C. y Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol* 13, 1161-1169.

Luo, G., Yao, M. S., Bender, C. F., Mills, M., Bladl, A. R., Bradley, A. y Petrini, J. H. (1999). Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7376-7381.

Ma, W., Halweg, C. J., Menendez, D. y Resnick, M. A. (2012). Differential effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition on DNA break repair in human cells are revealed with Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6590-6595.

Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. y Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781-794.

Macia, A., Blanco-Jimenez, E. y Garcia-Perez, J. L. (2015). Retrotransposons in pluripotent cells: Impact and new roles in cellular plasticity. *Biochim Biophys Acta* 1849, 417-426.

Macia, A., Munoz-Lopez, M., Cortes, J. L., Hastings, R. K., Morell, S., Lucena-Aguilar, G., Marchal, J. A., Badge, R. M. y Garcia-Perez, J. L. (2011). Epigenetic control of retrotransposon expression in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 31, 300-316.

Madabhushi, R., Gao, F., Pfenning, A. R., Pan, L., Yamakawa, S., Seo, J., Rueda, R., Phan, T. X., Yamakawa, H., Pao, P. C., y col. (2015). Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. *Cell* 161, 1592-1605.

Madabhushi, R., Pan, L. y Tsai, L. H. (2014). DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron* 83, 266-282.

Magdalou, I., Lopez, B. S., Pasero, P. y Lambert, S. A. (2014). The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin Cell Dev Biol* 30, 154-164.

Mager, D. L. y Stoye, J. P. (2015). Mammalian Endogenous Retroviruses. *Microbiol Spectr* 3, MDNA3-0009-2014.

Mahaney, B. L., Meek, K. y Lees-Miller, S. P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* 417, 639-650.

Maksakova, I. A., Romanish, M. T., Gagnier, L., Dunn, C. A., van de Lagemaat, L. N. y Mager, D. L. (2006). Retroviral elements and their hosts: insertional mutagenesis in the mouse germ line. *PLoS Genet* 2, e2.

Maletic-Savatic, M., Malinow, R. y Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283, 1923-1927.

Mallette, F. A., Mattioli, F., Cui, G., Young, L. C., Hendzel, M. J., Mer, G., Sixma, T. K. y Richard, S. (2012). RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *Embo J* 31, 1865-1878.

Malu, S., Malshetty, V., Francis, D. y Cortes, P. (2012). Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. *Immunol Res* 54, 233-246.

Manis, J. P., Morales, J. C., Xia, Z., Kutok, J. L., Alt, F. W. y Carpenter, P. B. (2004). 53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination. *Nat Immunol* 5, 481-487.

Martinez, S. y Belmonte, C. (1996). C-Fos expression in trigeminal nucleus neurons after chemical irritation of the cornea: reduction by selective blockade of nociceptor chemosensitivity. *Exp Brain Res* 109, 56-62.

Maze, I., Feng, J., Wilkinson, M. B., Sun, H., Shen, L. y Nestler, E. J. (2011). Cocaine dynamically regulates heterochromatin and repetitive element unsilencing in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3035-3040.

McKinnon, P. J. (2009). DNA repair deficiency and neurological disease. *Nat Rev Neurosci* 10, 100-112.

McKinnon, P. J. (2013). Maintaining genome stability in the nervous system. *Nat Neurosci* 16, 1523-1529.

Meek, K., Dang, V. y Lees-Miller, S. P. (2008). DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv Immunol* 99, 33-58.

Mehta, A. y Haber, J. E. (2014). Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a016428.

Mirkin, E. V. y Mirkin, S. M. (2007). Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 13-35.

Mitra, R., Li, X., Kapusta, A., Mayhew, D., Mitra, R. D., Feschotte, C. y Craig, N. L. (2013). Functional characterization of piggyBat from the bat *Myotis lucifugus* unveils an active mammalian DNA transposon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 234-239.

Mizuuchi, K. (1992). Transpositional recombination: mechanistic insights from studies of mu and other elements. *Annu Rev Biochem* 61, 1011-1051.

Morales, J. C., Xia, Z., Lu, T., Aldrich, M. B., Wang, B., Rosales, C., Kellems, R. E., Hittelman, W. N., Elledge, S. J. y Carpenter, P. B. (2003). Role for the BRCA1 C-terminal repeats (BRCT) protein 53BP1 in maintaining genomic stability. *J Biol Chem* 278, 14971-14977.

Moran, J. V., DeBerardinis, R. J. y Kazazian, H. H., Jr. (1999). Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* 283, 1530-1534.

Moran, J. V., Holmes, S. E., Naas, T. P., DeBerardinis, R. J., Boeke, J. D. y Kazazian, H. H., Jr. (1996). High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell* 87, 917-927.

Morrish, T. A., Garcia-Perez, J. L., Stamato, T. D., Taccioli, G. E., Sekiguchi, J. y Moran, J. V. (2007). Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres. *Nature* 446, 208-212.

Morrish, T. A., Gilbert, N., Myers, J. S., Vincent, B. J., Stamato, T. D., Taccioli, G. E., Batzer, M. A. y Moran, J. V. (2002). DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* 31, 159-165.

Moskwa, P. (2016). Repair of Double-Strand Breaks by Nonhomologous End Joining: Its Components and Their Function. Perteneciente al libro: Kovalchuk, I. y Kovalchuk, O. (2016). *Genome Stability*, (321-336), Acad Press, Elsevier, ISBN: 978-0-12-803309-8.

Moyal, L., Lerenthal, Y., Gana-Weisz, M., Mass, G., So, S., Wang, S. Y., Eppink, B., Chung, Y. M., Shalev, G., Shema, E., y col. (2011). Requirement of ATM-dependent monoubiquitylation of histone H2B for timely repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 41, 529-542.

Munoz-Lopez, M. y Garcia-Perez, J. L. (2010). DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics* 11, 115-128.

Munoz-Lopez, M., Siddique, A., Bischerour, J., Lorite, P., Chalmers, R. y Palomeque, T. (2008). Transposition of Mboumar-9: identification of a new naturally active mariner-family transposon. *J Mol Biol* 382, 567-572.

Muotri, A. R., Chu, V. T., Marchetto, M. C., Deng, W., Moran, J. V. y Gage, F. H. (2005). Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 435, 903-910.

Muotri, A. R. y Gage, F. H. (2006). Generation of neuronal variability and complexity. *Nature* 441, 1087-1093.

Muotri, A. R., Marchetto, M. C., Coufal, N. G., Oefner, R., Yeo, G., Nakashima, K. y Gage, F. H. (2010). L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* 468, 443-446.

Muotri, A. R., Zhao, C., Marchetto, M. C. y Gage, F. H. (2009). Environmental influence on L1 retrotransposons in the adult hippocampus. *Hippocampus* 19, 1002-1007.

Murai, M., Enokido, Y., Inamura, N., Yoshino, M., Nakatsu, Y., van der Horst, G. T., Hoeijmakers, J. H., Tanaka, K., y Hatanaka, H. (2001). Early postnatal ataxia and abnormal cerebellar development in mice lacking Xeroderma pigmentosum Group A and Cockayne syndrome Group B DNA repair genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13379-13384.

Nimonkar, A. V., Ozsoy, A. Z., Genschel, J., Modrich, P. y Kowalczykowski, S. C. (2008). Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16906-16911.

Nospikel, T. y Hanawalt, P. C. (2003). When parsimony backfires: neglecting DNA repair may doom neurons in Alzheimer's disease. *Bioessays* 25, 168-173.

Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M. C. y Li, G. C. (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 382, 551-555.

Obbard, D. J., Gordon, K. H., Buck, A. H. y Jiggins, F. M. (2009). The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 99-115.

Ochi, T., Blackford, A. N., Coates, J., Jhujh, S., Mehmood, S., Tamura, N., Travers, J., Wu, Q., Draviam, V. M., Robinson, C. V., y col. (2015). DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science* 347, 185-188.

O'Driscoll, M., Dobyns, W. B., van Hagen, J. M. y Jeggo, P. A. (2007). Cellular and clinical impact of haploinsufficiency for genes involved in ATR signaling. *Am J Hum Genet* 81, 77-86.

Okuyama, T., Kitamura, T., Roy, D. S., Itohara, S. y Tonegawa, S. (2016). Ventral CA1 neurons store social memory. *Science* 353, 1536-1541.

O'Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., Levy, R., Ko, A., Lee, C., Smith, J. D., y col. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 485, 246-250.

Ostertag, E. M. y Kazazian, H. H., Jr. (2001). Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet* 35, 501-538.

Panier, S. y Durocher, D. (2013). Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 661-672.

Paquola, A., Erwin, J. y Gage, F. (2017). Insights into the role of somatic mosaicism in the brain. *Current Opinion in Systems Biology*, doi:10.1016/j.coisb.2016.12.004.

Paxinos, G., y Franklin, K. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition, Academic Press, ISBN: 0-12-547636-1.

Pellegrini, L., Yu, D. S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T. L. y Venkitaraman, A. R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* 420, 287-293.

Pena De Ortiz, S. y Arshavsky, Y. (2001). DNA recombination as a possible mechanism in declarative memory: a hypothesis. *J Neurosci Res* 63, 72-81.

Pena De Ortiz, S., Colon, M., Carrasquillo, Y., Padilla, B. y Arshavsky, Y. I. (2003). Experience-dependent expression of terminal deoxynucleotidyl transferase in mouse brain. *Neuroreport* 14, 1141-1144.

Petit-Demouliere, B., Chenu, F. y Bourin, M. (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* 177, 245-255.

Pfeiffer, P., Goedecke, W. y Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15, 289-302.

Pierce, A. J., Stark, J. M., Araujo, F. D., Moynahan, M. E., Berwick, M. y Jasin, M. (2001). Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 11, S52-59.

Pimpinelli, S., Berloco, M., Fanti, L., Dimitri, P., Bonaccorsi, S., Marchetti, E., Caizzi, R., Caggese, C. y Gatti, M. (1995). Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3804-3808.

Ponomarev, I., Rau, V., Eger, E. I., Harris, R. A. y Fanselow, M. S. (2010). Amygdala transcriptome and cellular mechanisms underlying stress-enhanced fear learning in a rat model of posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 35, 1402-1411.

Ponomarev, I., Wang, S., Zhang, L., Harris, R. A. y Mayfield, R. D. (2012). Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *J Neurosci* 32, 1884-1897.

Povirk, L. F., Zhou, T., Zhou, R., Cowan, M. J. y Yannone, S. M. (2007). Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by Artemis nuclease. *J Biol Chem* 282, 3547-3558.

Prado, F. y Aguilera, A. (2005). Impairment of replication fork progression mediates RNA polII transcription-associated recombination. *Embo J* 24, 1267-1276.

Prak, E. T. y Kazazian, H. H., Jr. (2000). Mobile elements and the human genome. *Nat Rev Genet* 1, 134-144.

Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W. y Jasin, M. (2015). Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a016600.

Price, B. D. y D'Andrea, A. D. (2013). Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* 152, 1344-1354.

Qi, Z., Redding, S., Lee, J. Y., Gibb, B., Kwon, Y., Niu, H., Gaines, W. A., Sung, P. y Greene, E. C. (2015). DNA sequence alignment by microhomology sampling during homologous recombination. *Cell* 160, 856-869.

Quevedo, J., Vianna, M. R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I. y Rose, S. P. (1999). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 6, 600-607.

Ramadan, K., Shevelev, I. V., Maga, G. y Hubscher, U. (2004). De novo DNA synthesis by human DNA polymerase lambda, DNA polymerase mu and terminal deoxyribonucleotidyl transferase. *J Mol Biol* 339, 395-404.

Ramsden, D. A. (2011). Polymerases in nonhomologous end joining: building a bridge over broken chromosomes. *Antioxid Redox Signal* 14, 2509-2519.

Reilly, M. T., Faulkner, G. J., Dubnau, J., Ponomarev, I. y Gage, F. H. (2013). The role of transposable elements in health and diseases of the central nervous system. *J Neurosci* 33, 17577-17586.

Ren, K. y Pena de Ortiz, S. (2002). Non-homologous DNA end joining in the mature rat brain. *J Neurochem* 80, 949-959.

Richardson, C. y Jasin, M. (2000). Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 20, 9068-9075.

Richardson, J. M., Dawson, A., O'Hagan, N., Taylor, P., Finnegan, D. J. y Walkinshaw, M. D. (2006). Mechanism of Mos1 transposition: insights from structural analysis. *Embo J* 25, 1324-1334.

Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. y Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.

Rowold, D. J. y Herrera, R. J. (2000). Alu elements and the human genome. *Genetica* 108, 57-72.

Rubin, G. M., Kidwell, M. G. y Bingham, P. M. (1982). The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the nature of induced mutations. *Cell* 29, 987-994.

Ruiz, R., Cano, R., Casanas, J. J., Gaffield, M. A., Betz, W. J. y Tabares, L. (2011). Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. *J Neurosci* 31, 2000-2008.

Saavedra-Rodriguez, L., Vazquez, A., Ortiz-Zuazaga, H. G., Chorna, N. E., Gonzalez, F. A., Andres, L., Rodriguez, K., Ramirez, F., Rodriguez, A. y Pena de Ortiz, S. (2009). Identification of flap structure-specific endonuclease 1 as a factor involved in long-term memory formation of aversive learning. *J Neurosci* 29, 5726-5737.

Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J. y Jackson, S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 509-514.

Sawada, M., Sun, W., Hayes, P., Leskov, K., Boothman, D. A. y Matsuyama, S. (2003). Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat Cell Biol* 5, 320-329.

Sayah, D. M., Sokolskaja, E., Berthoux, L. y Luban, J. (2004). Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature* 430, 569-573.

Schatz, D. G. (2004). V(D)J recombination. *Immunol Rev* 200, 5-11.

Schumann, C. M., Barnes, C. C., Lord, C. y Courchesne, E. (2009). Amygdala enlargement in toddlers with autism related to severity of social and communication impairments. *Biol Psychiatry* 66, 942-949.

Schumann, G. G. (2007). APOBEC3 proteins: major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition. *Biochem Soc Trans* 35, 637-642.

Schwarz, K. y Bartram, C. R. (1996). V(D)J recombination pathology. *Adv Immunol* 61, 285-326.

Sharma, N., Gabel, H. W. y Greenberg, M. E. (2015). A Shortcut to Activity-Dependent Transcription. *Cell* 161, 1496-1498.

Sharma, N., Gabel, H. W. y Greenberg, M. E. (2015). A Shortcut to Activity-Dependent Transcription. *Cell* 161, 1496-1498.

Shen, J., Gilmore, E. C., Marshall, C. A., Haddadin, M., Reynolds, J. J., Eyaid, W., Bodell, A., Barry, B., Gleason, D., Allen, K., y col. (2010). Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nat Genet* 42, 245-249.

Shibata, A., Barton, O., Noon, A. T., Dahm, K., Deckbar, D., Goodarzi, A. A., Lobrich, M. y Jeggo, P. A. (2010). Role of ATM and the damage response mediator proteins 53BP1 and MDC1 in the maintenance of G(2)/M checkpoint arrest. *Mol Cell Biol* 30, 3371-3383.

Singer, T., McConnell, M. J., Marchetto, M. C., Coufal, N. G. y Gage, F. H. (2010). LINE-1 retrotransposons: mediators of somatic variation in neuronal genomes? *Trends Neurosci* 33, 345-354.

Singh, T. R., Ali, A. M., Busygina, V., Raynard, S., Fan, Q., Du, C. H., Andreassen, P. R., Sung, P. y Meetei, A. R. (2008). BLAP18/RMI2, a novel OB-fold-containing protein, is an essential component of the Bloom helicase-double Holliday junction dissolvasome. *Genes Dev* 22, 2856-2868.

Sinibaldi-Vallebona, P., Lavia, P., Garaci, E. y Spadafora, C. (2006). A role for endogenous reverse transcriptase in tumorigenesis and as a target in differentiating cancer therapy. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 1-10.

Smit, A. F. y Riggs, A. D. (1996). Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1443-1448.

Smith, G. C. y Jackson, S. P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13, 916-934.

Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P. y de Villartay, J. P. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* 26, 7780-7791.

Squire, L. R., Genzel, L., Wixted, J. T. y Morris, R. G. (2015). Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a021766.

Stetson, D. B., Ko, J. S., Heidmann, T. y Medzhitov, R. (2008). Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134, 587-598.

Stewart, G. S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A. K., Kolas, N. K., Miller, E. S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M., y col. (2009). The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* 136, 420-434.

Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M. y Jeggo, P. A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 64, 2390-2396.

Stocking, C. y Kozak, C. A. (2008). Murine endogenous retroviruses. *Cell Mol Life Sci* 65, 3383-3398.

Stracker, T. H. y Petrini, J. H. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 90-103.

Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S. y Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci* 15, 655-669.

Suberbielle, E., Djukic, B., Evans, M., Kim, D. H., Taneja, P., Wang, X., Finucane, M., Knox, J., Ho, K., Devidze, N., y col. (2015). DNA repair factor BRCA1 depletion occurs in Alzheimer brains and impairs cognitive function in mice. *Nat Commun* 6, 8897.

Suberbielle, E., Sanchez, P. E., Kravitz, A. V., Wang, X., Ho, K., Eilertson, K., Devidze, N., Kreitzer, A. C. y Mucke, L. (2013). Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 16, 613-621.

Sun, L. V., Jin, K., Liu, Y., Yang, W., Xie, X., Ye, L., Wang, L., Zhu, L., Ding, S., Su, Y., y col. (2008). PBmice: an integrated database system of piggyBac (PB) insertional mutations and their characterizations in mice. *Nucleic Acids Res* 36, D729-734.

Suzuki, J., Yamaguchi, K., Kajikawa, M., Ichiyangi, K., Adachi, N., Koyama, H., Takeda, S. y Okada, N. (2009). Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition. *PLoS Genet* 5, e1000461.

Swergold, G. D. (1990). Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol Cell Biol* 10, 6718-6729.

Symington, L. S. (2014). End resection at double-strand breaks: mechanism and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6:a016436.

Symington, L. S. y Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* 45, 247-271.

Taubenfeld, S. M., Milekic, M. H., Monti, B. y Alberini, C. M. (2001). The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4, 813-818.

Thomas, C. A., Paquola, A. C. y Muotri, A. R. (2012). LINE-1 retrotransposition in the nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28, 555-573.

Thompson, L. H. (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutat Res* 751, 158-246.

Toni, N., Buchs, P. A., Nikonenko, I., Bron, C. R. y Muller, D. (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402, 421-425.

Upton, K. R., Gerhardt, D. J., Jesuadian, J. S., Richardson, S. R., Sanchez-Luque, F. J., Bodea, G. O., Ewing, A. D., Salvador-Palomeque, C., van der Knaap, M. S., Brennan, P. M., y col. (2015). Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell* 161, 228-239.

van der Horst, G. T., van Steeg, H., Berg, R. J., van Gool, A. J., de Wit, J., Weeda, G., Morreau, H., Beems, R. B., van Kreijl, C. F., de Gruijl, F. R., y col. (1997). Defective transcription-coupled repair in Cockayne syndrome B mice is associated with skin cancer predisposition. *Cell* 89, 425-435.

van Praag, H., Kempermann, G. y Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1, 191-198.

Veltman, J. A. y Brunner, H. G. (2012). De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet* 13, 565-575.

Vilenchik, M. M. y Knudson, A. G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12871-12876.

Vogel, E. K. y Machizawa, M. G. (2004). Neural activity predicts individual differences in visual working memory capacity. *Nature* 428, 748-751.

Ward, I. M., Minn, K., van Deursen, J. y Chen, J. (2003). p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Mol Cell Biol* 23, 2556-2563.

Ward, J. F. (1994). The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int J Radiat Biol* 66, 427-432.

Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., y col. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562.

Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A. y Van Eldik, L. J. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet* 5, 88.

Webster, S. J., Bachstetter, A. D. y Van Eldik, L. J. (2013). Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 5, 28.

Wei, W., Gilbert, N., Ooi, S. L., Lawler, J. F., Ostertag, E. M., Kazazian, H. H., Boeke, J. D. y Moran, J. V. (2001). Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Mol Cell Biol* 21, 1429-1439.

West, S. C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 435-445.

Wissing, S., Munoz-Lopez, M., Macia, A., Yang, Z., Montano, M., Collins, W., Garcia-Perez, J. L., Moran, J. V. y Greene, W. C. (2012). Reprogramming somatic cells into iPS cells activates LINE-1 retroelement mobility. *Hum Mol Genet* 21, 208-218.

Woodbine, L., Neal, J. A., Sasi, N. K., Shimada, M., Deem, K., Coleman, H., Dobyns, W. B., Ogi, T., Meek, K., Davies, E. G. y Jeggo, P. A. (2013). PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *J Clin Invest* 123, 2969-2980.

Wyrobek, A. J., Schmid, T. E. y Marchetti, F. (2005). Relative susceptibilities of male germ cells to genetic defects induced by cancer chemotherapies. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 31-35.

Xiao, Y. y Weaver, D. T. (1997). Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 25, 2985-2991.

Xu, Y., Sun, Y., Jiang, X., Ayrapetov, M. K., Moskwa, P., Yang, S., Weinstock, D. M. y Price, B. D. (2010). The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair. *J Cell Biol* 191, 31-43.

Yamaguchi, K., Kajikawa, M. y Okada, N. (2015). LINE retrotransposition and host DNA repair machinery. *Mob Genet Elements* 5, 92-97.

Yang, N. y Kazazian, H. H., Jr. (2006). L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nat Struct Mol Biol* 13, 763-771.

Yannone, S. M., Khan, I. S., Zhou, R. Z., Zhou, T., Valerie, K. y Povirk, L. F. (2008). Coordinate 5' and 3' endonucleolytic trimming of terminally blocked blunt DNA double-strand break ends by Artemis nuclease and DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Res* 36, 3354-3365.

Yoder, J. A., Walsh, C. P. y Bestor, T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13, 335-340.

Yuan, Z. y Seto, E. (2007). A functional link between SIRT1 deacetylase and NBS1 in DNA damage response. *Cell Cycle* 6, 2869-2871.

Zeng, Z., Cortes-Ledesma, F., El Khamisy, S. F. y Caldecott, K. W. (2011). TDP2/TTRAP is the major 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase activity in vertebrate cells and is critical for cellular resistance to topoisomerase II-induced DNA damage. *J Biol Chem* 286, 403-409.

Zhang, Y., Gostissa, M., Hildebrand, D. G., Becker, M. S., Boboila, C., Chiarle, R., Lewis, S. y Alt, F. W. (2010). The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Adv Immunol* 106, 93-133.

Zhang, Y., Maksakova, I. A., Gagnier, L., van de Lagemaat, L. N. y Mager, D. L. (2008). Genome-wide assessments reveal extremely high levels of polymorphism of two active families of mouse endogenous retroviral elements. *PLoS Genet* 4, e1000007.

Zhang, Z., Harrison, P. M., Liu, Y. y Gerstein, M. (2003). Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome. *Genome Res* 13, 2541-2558.

Zhou, L., Mitra, R., Atkinson, P. W., Hickman, A. B., Dyda, F. y Craig, N. L. (2004). Transposition of hAT elements links transposable elements and V(D)J recombination. *Nature* 432, 995-1001.

Zhu, C., Bogue, M. A., Lim, D. S., Hasty, P. y Roth, D. B. (1996). Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. *Cell* 86, 379-389.

Zhu, J., Petersen, S., Tessarollo, L. y Nussenzweig, A. (2001). Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* 11, 105-109.

ANEXOS

ANEXOS (I): Tablas

- ✓ 1. Mecanismos y componentes de la respuesta al daño en el ADN.
- ✓ 2. Valores estadísticos del estudio de la inserción de L1 tras la exploración de un ambiente rico en el hipocampo de ratón.
- ✓ 3. Valores estadísticos del estudio de la inserción de L1 tras la exploración de un ambiente rico y bloqueo farmacológico de la neurotransmisión glutamatérgica.
- ✓ 4. Valores estadísticos del estudio de la inserción de L1 tras la exploración de un ambiente rico y bloqueo farmacológico de la retrotransposición.
- ✓ 5. Valores estadísticos del estudio de la activación de los genes de respuesta temprana c-Fos y Egr1 tras la exploración de un AR donde se ha bloqueado farmacológicamente la retrotranscripción.
- ✓ 6. Valores estadísticos del estudio de la inhibición genética con OASs contra ORF1 y ORF2 en el test de evitación pasiva.
- ✓ 7. Valores estadísticos del estudio de la activación de la proteína 53BP1 en el giro dentado y en la corteza prefrontal de ratones tras la exposición a un AR.
- ✓ 8. Valores estadísticos del estudio de expresión de los genes relacionados con el metabolismo del ADN en el giro dentado y en la corteza prefrontal de ratones tras la exposición a un AR.
- ✓ 9. Valores estadísticos del estudio de la inhibición genética con OASs contra TDP1, TDP2 y H2AX en el test de evitación pasiva.
- ✓ 10. Valores estadísticos del estudio anatómico del cerebro de ratones silvestres y mutantes nulos para H2AX.
- ✓ 11. Valores estadísticos del estudio morfológico específico de las neuronas maduras del hipocampo y la amígdala en el cerebro de ratones silvestres y mutantes nulos para H2AX.
- ✓ 12. Valores estadísticos del estudio sináptico de excitación/inhibición en el hipocampo, la corteza prefrontal y en la amígdala del cerebro de ratones silvestres y mutantes nulos para H2AX.
- ✓ 13. Valores estadísticos del estudio de la caracterización conductual de los ratones silvestres y mutantes nulos para H2AX.

MECANISMO DE RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN	TIPO DE LESIONES	COMPONENTES PRINCIPALES
Reversión directa del daño	Fotoproductos de la radiación UV; O ⁶ alquilguanina	Fotoliasas; O ⁶ metilguanina metiltransferasa
Reparación de emparejamientos erróneos, MMR (del inglés, "Mismatch Repair")	Bases erróneamente emparejadas Bucles de inserción/delección de la replicación del ADN	MSH2-MSH6, EXO1, Polimerasas δ y ϵ , PCNA, RFC, RPA, Ligasa I
Reparación por escisión de bases, BER (del inglés, "Base Excision Repair") y reparación de roturas de cadena única	Bases de ADN anormales, SSBs, daño oxidativo, actividad abortiva de la Topoisomerasa I	ADN glicosilasas, APE1, FEN1, ADN polimerasas β , δ , ϵ , Ligasa I o III y sus factores asociados. XRCC1, PARP-1 y 2, PNK y APTX
Reparación por escisión de nucleótidos, NER (del inglés, "Nucleotide Excision Repair")	Lesiones que rompen la estructura de la doble hélice de ADN, como los productos voluminosos en las bases y los foto-productos UV	Factores de elongación de la actividad ARN polimerasa (XPC-H223B o TFIIH, entre otros), ADN polimerasas, RPA, Ligasa I
Reparación propensa a error: Síntesis por translesión del ADN	Daños en las bases que bloquean la progresión de la horquilla de replicación	ADN Polimerasas propensas a errores (η , ι , κ ...) y sus factores asociados
Unión de extremos no homólogos, NHEJ (del inglés, "Non-Homologous End-Joining")	DSBs provocadas por radiación o por compuestos químicos además de las que produce la recombinación V(D)J y el cambio de clase en la producción de las IGs	Heterodímero Ku70-Ku80, DNA-PKcs, XRCC4, XLF/Cernunnos y Ligasa IV. También puede implicar el complejo MRE11-RAD50-NBS1, Artemis, PNK, APTX, TDP1, TDP2 y las polimerasas μ y λ
Recombinación homóloga, HR (del inglés, "Homologous Recombination")	DSBs, estancamientos en la horquilla de replicación, entrecruzamientos entre las cadenas de ADN, recombinación meiótica y actividad abortiva de la Topoisomerasa II	RAD51, RAD52, RAD54, BRCA2, RPA, FEN1, ADN polimerasas y factores asociados.

Tabla ANEXO 1. Mecanismos y componentes de la respuesta al daño en el ADN. Modificado de Jackson y col., 2009.

TABLA ANEXO 2A. Valores estadísticos del estudio de expresión génica de LINE-1 tras la exploración de un nuevo entorno en el hipocampo de ratón.

TIEMPO	VALOR orf1 (MEDIA±ERROR)	VALOR orf2 (MEDIA±ERROR)	ESTADÍSTICA orf1	ESTADÍSTICA orf2
NAR	1,000±0,045	1,000±0,125	[F(5,24)=4,950; p=0,002] p (NAR-AR 1 h)=0,004	[F(5,24)=7,010; p<0,001] p (NAR-AR 1 h)=0,001
AR 0,5 h	2,291±0,287	3,324±0,366		
AR 1 h	2,916±0,517	6,549±1,595		
AR 3 h	2,015±0,348	2,991±0,592		
AR 6 h	1,777±0,267	2,377±0,506		
AR 24 h	1,293±0,189	1,347±0,293		

Tabla ANEXO 2A: Resumen del valor estadístico obtenido para la cuantificación de la expresión génica de LINE-1 en el hipocampo de ratones tras la exposición a un entorno enriquecido. La tabla muestra el valor promedio ± error del valor de expresión génica relativizado con respecto al NAR en el hipocampo. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis de ANOVA de una vía y comparaciones múltiples (con respecto al NAR) para los datos representados en la figura 1B. n=4-5 ratones por tiempo. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico.

TABLA ANEXO 2B. Valores estadísticos del estudio de la inserción génica de LINE-1 tras la exploración de un nuevo entorno en el hipocampo de ratón.

TIEMPO	VALOR ORF1 (MEDIA±ERROR)	VALOR ORF2 (MEDIA±ERROR)	ESTADÍSTICA ORF1	ESTADÍSTICA ORF2
NAR	1,000±0,382	1,000±0,234	[F(5,24)=0,240; p=0,940]	[F(5,24)=24,00; p<0,001] p (NAR-AR 0,5, 1, 3, 6, 24 h) <0,001
AR 0,5 h	1,088±0,613	0,717±0,197		
AR 1 h	0,897±0,120	4,651±0,533		
AR 3 h	0,741±0,142	5,220±0,606		
AR 6 h	0,630±0,069	4,114±1,672		
AR 24 h	0,881±0,364	4,737±1,170		

Tabla ANEXO 2B: Resumen del valor estadístico obtenido para la cuantificación de la estimación de cantidad de copias de LINE-1 en el hipocampo de ratones tras la exposición a un entorno enriquecido. La tabla muestra el valor promedio ± error de la estimación de la cantidad de copias de ORF1 y ORF2 relativizado con respecto al NAR para cada uno de los tiempos de estudio en el hipocampo. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis de ANOVA de una vía y comparaciones múltiples (con respecto al NAR) para los datos representados en la figura 1C. n=4-5 ratones por tiempo. NAR: No Ambiente Rico.

TABLA ANEXO 3. Valores estadísticos del estudio de la inserción genómica de LINE-1 tras la exploración de un nuevo entorno donde se ha bloqueado farmacológicamente la neurotransmisión glutamatérgica.

TIEMPO	VALOR ORF2 VEHÍCULO (MEDIA±ERROR)	VALOR ORF2 CPP/NBQX (MEDIA±ERROR)	ESTADÍSTICA ORF2
NAR	1,000±0,057	1,000±0,078	[F(3,8)=28,98; p<0,001]
AR 1 h	2,289±0,082	1,094±0,133	p (NAR Vehículo-AR Vehículo) <0,001 p (AR Vehículo-AR CPP/NBQX) <0,001

Tabla ANEXO 3: Resumen del valor estadístico obtenido para la cuantificación de la estimación de cantidad de copias ORF2 en el hipocampo de ratones en los que ha sido inhibida la neurotransmisión glutamatérgica previamente a la exposición a un entorno enriquecido. La tabla muestra el valor promedio ± error de la estimación de la cantidad de copias de ORF2, relativizado con respecto al NAR para cada uno de los tratamientos en el hipocampo de ratones. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis de ANOVA de una vía y comparaciones múltiples (con respecto al NAR) para los datos representados en la figura 2B. n=3 ratones por tiempo y tratamiento. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico.

TABLA ANEXO 4. Valores estadísticos del estudio de la inserción genómica de LINE-1 tras la exploración de un nuevo entorno donde se ha bloqueado farmacológicamente la retrotranscripción.

TIEMPO	VALOR ORF1 VEHÍCULO (MEDIA±ERROR)	VALOR ORF1 LAMIVUDINA (MEDIA±ERROR)	VALOR ORF1 ACYCLOVIR (MEDIA±ERROR)	ESTADÍSTICA ORF1
NAR	1,000±0,148	1,000±0,094	1,000±0,154	[F(2,18)=0,989; p=0,402]
AR 2 h	1,435±0,236	0,929±0,248	1,092±0,059	

TIEMPO	VALOR ORF2 VEHÍCULO (MEDIA±ERROR)	VALOR ORF2 LAMIVUDINA (MEDIA±ERROR)	VALOR ORF2 ACYCLOVIR (MEDIA±ERROR)	ESTADÍSTICA ORF2
NAR	1,000±0,047	1,000±0,080	1,000±0,094	[F(2,18)=9,359; p<0,001] p (NAR Vehículo- AR Vehículo) <0,001 p (AR Vehículo-AR Lamivudina) <0,001 p (AR Vehículo-AR Acyclovir) <0,001
AR 2 h	2,595±0,560	0,906±0,149	0,957±0,251	

Tabla ANEXO 4: Resumen del valor estadístico obtenido para la cuantificación de la estimación de cantidad de copias ORF1 y ORF2 en el hipocampo de ratones en los que ha sido bloqueada farmacológicamente la retrotransposición tras la exposición a un entorno enriquecido. Las tablas superior e inferior muestran el valor promedio ± error de la estimación de la cantidad de copias de ORF1 y ORF2, respectivamente, relativizado con respecto al NAR para cada uno de los tratamientos en el hipocampo de ratones. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis de ANOVA de dos vías y comparaciones múltiples (con respecto al NAR) para los datos representados en la figura 3B. n=3 ratones por tiempo y tratamiento. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico.

TABLA ANEXO 5. Valores estadísticos del estudio de la activación de los genes de respuesta temprana c-Fos y Egr1 tras la exploración de un nuevo entorno donde se ha bloqueado farmacológicamente la retrotranscripción.

TIEMPO	c-Fos VEHÍCULO (MEDIA±ERROR)	c-Fos LAMIVUDINA (MEDIA±ERROR)	c-Fos ACYCLOVIR (MEDIA±ERROR)	ESTADÍSTICA c-Fos
NAR	1,000±0,107	1,000±0,167	1,000±0,136	[F(2,31)=0,122; p=0,886]
AR 2 h	2,481±0,313	2,584±0,286	2,626±0,333	p (NAR Vehículo, Lamivudina, Acyclovir -AR Vehículo, Lamivudina, Acyclovir)<0,001

TIEMPO	Egr1 VEHÍCULO (MEDIA±ERROR)	Egr1 LAMIVUDINA (MEDIA±ERROR)	Egr1 ACYCLOVIR (MEDIA±ERROR)	ESTADÍSTICA Egr1
NAR	(1,000±0,128)	(1,000±0,065)	(1,000±0,094)	[F(2,22)=1,806; p=0,188]
AR 2 h	(2,166±0,154)	(1,837±0,156)	(2,456±0,117)	p (NAR Vehículo, Lamivudina, Acyclovir -AR Vehículo, Lamivudina, Acyclovir)<0,001

Tabla ANEXO 5: Resumen del valor estadístico obtenido para la cuantificación de la inducción de los genes de respuesta temprana en el giro dentado del hipocampo de ratones en los que ha sido bloqueada farmacológicamente la retrotransposición tras la exposición a un entorno enriquecido. Las tablas superior e inferior muestran el valor promedio ± error del nivel de inducción de la activación de los genes tempranos c-Fos y Egr1, respectivamente, obtenido de la cuantificación de las células c-Fos+ y Egr1+ relativizado con respecto al NAR para cada uno de los tratamientos en el giro dentado del hipocampo de ratones. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis de ANOVA de dos vías y comparaciones múltiples (con respecto al NAR) para los datos representados en la figura 4B y C. n=3 ratones por tiempo y tratamiento, con un mínimo de 3 imágenes de cada uno de ellos. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico.

TABLA ANEXO 6A. Valores estadísticos obtenidos de la estimación de la cantidad de copias ORF2 en el estudio del bloqueo mediante OASs previo a una sesión de exploración de un nuevo contexto enriquecido.

EXPRESIÓN GÉNICA	CANTIDAD DE COPIAS ORF2 (Veces con respecto al NAR) (MEDIA ± ERROR)	ESTADÍSTICA (Con respecto al valor random)
NAR	1,000±0,187	p=0,001
OAS Random	2,856±0,525	
OAS orf1	1,121±0,341	p=0,004
OAS orf2	0,955±0,300	p=0,007

Tabla ANEXO 6A: Resumen de los valores de expresión génica obtenidos tras una sesión de ambiente rico con administración previa de OAS en el hipocampo de ratones. La tabla muestra el valor promedio ± error de la cantidad de copias ORF2 con respecto al valor obtenido para el NAR. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis de comparaciones múltiples, representados en la figura 5C. n=5-8 ratones por tiempo. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico; OAS: Oligonucleótidos AntiSentido.

TABLA ANEXO 6B: Valores de latencia de entrada en la prueba de evitación pasiva en el estudio de la inhibición local mediante OASs de L1.

OAS	LATENCIA ENT. (s) (MEDIA±ERROR)	MCP VECES LATENCIA ENT. (MEDIA±ERROR)	MLP VECES LATENCIA ENT. (MEDIA±ERROR)
OAS Random	8,625±1,053	4,320±1,242	5,140±0,866
OAS orf1	8,829±2,422	3,740±0,443	1,720±0,468
OAS orf2	8,557±1,504	4,410±1,402	1,990±0,0675

Tabla ANEXO 6B: Latencias de entrada (s) en el entrenamiento, la MCP y MLP en la prueba de evitación pasiva. Datos de la media de las latencias de entrada en el entrenamiento, MCP y MLP por cada grupo experimental ± error estándar medio. ENT.: Entrenamiento; MCP: Memoria a Corto Plazo; MLP: Memoria a Largo Plazo.

TABLA ANEXO 6C: Valores estadísticos obtenidos del estudio de la inhibición local mediante OASs de L1 en la prueba de evitación pasiva.

OAS	ESTADÍSTICA (Veces con respecto al ENT.)	ESTADÍSTICA MCP (Veces con respecto al Random)	ESTADÍSTICA MLP (Veces con respecto al Random)
OAS Random	p (MCP)=0,023 p (MLP)=0,001		
OAS orf1	p (MCP)=0,002	p (MCP)=0,891	p (MLP)=0,009
OAS orf2	p (MCP)=0,045	p (MCP)=0,833	p (MLP)=0,017

Tabla ANEXO 6C: Valores estadísticos obtenidos para la figura 5. La tabla muestra el valor estadístico obtenido de las veces la latencia de entrada del entrenamiento mediante el análisis de comparaciones múltiples. Por un lado (columna 2), los valores de las veces la latencia de entrada del entrenamiento en la evaluación de la MCP y la MLP, cada grupo experimental con respecto al valor obtenido para su entrenamiento; y por otro (columnas 3 y 4) los valores en estas sesiones con respecto al grupo Random. ENT.: Entrenamiento; MCP: Memoria a Corto Plazo; MLP: Memoria a Largo Plazo.

TABLA ANEXO 7. Valores estadísticos del estudio de la activación de la proteína 53BP1 en el giro dentado y en la corteza prefrontal de ratones tras exposición a un entorno enriquecido.

TIEMPO	VALOR HP (MEDIA±ERROR)	VALOR CPF (MEDIA±ERROR)	ESTADÍSTICA HP	ESTADÍSTICA CPF
NAR	5,884±1,124	8,686±3,347	[F(4,24)=5,606; p=0,003] p (NAR- AR 3 h)=0,013 p (NAR- AR 6 h)=0,010	[F(4,24)=6,879; p<0,001] p (NAR- AR 24 h) <0,001
AR 1 h	9,028±1,367	11,330±1,435		
AR 3 h	12,530±1,322	10,390±1,201		
AR 6 h	12,320±1,415	18,320±4,443		
AR 24 h	6,864±1,316	28,180±3,103		

Tabla ANEXO 7: Resumen del valor estadístico obtenido para la cuantificación del porcentaje de células con focos de activación de la proteína 53BP1 en el giro dentado del hipocampo y en corteza prefrontal de ratones tras la exposición a un entorno enriquecido. La tabla muestra el valor promedio ± error del porcentaje de células 53BP1+ para cada uno de los tiempos de estudio en el giro dentado del hipocampo y en la corteza prefrontal. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis de ANOVA de una vía y comparaciones múltiples (con respecto al NAR) para los datos representados en la figura 7B. n=5 ratones por tiempo. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico; HP: Hipocampo; CPF: Corteza Prefrontal.

GEN	VALOR HP (MEDIA ± ERROR)	ESTADÍSTICA HP	VALOR CPF (MEDIA ± ERROR)	ESTADÍSTICA CPF
<i>rad51</i>	NAR: 1,000±0,030 AR 1 h: 4,112±0,839 AR 3 h: 1,744±0,335 AR 6 h: 0,634±0,057 AR 24 h: 0,622±0,138	[F(4,17)=11,18;p<0,001] p (NAR- AR 1 h) <0,001	NAR: 1,000±0,097 AR 1 h: 2,365±0,809 AR 3 h: 2,843±0,677 AR 6 h: 6,203±2,237 AR 24 h: 2,380±0,419	[F(4,11)=3,955;p=0,031] p (NAR- AR 6 h)=0,007
<i>rad52</i>	NAR: 1,000±0,139 AR 1 h: 1,601±0,233 AR 3 h: 1,202±0,334 AR 6 h: 1,291±0,139 AR 24 h: 0,716±0,338	[F(4,12)=1,535;p=0,254]	NAR: 1,000±0,103 AR 1 h: 1,757±0,331 AR 3 h: 2,397±0,821 AR 6 h: 6,060±1,520 AR 24 h: 2,965±0,390	[F(4,11)=6,333;p=0,007] p (NAR- AR 6 h)=0,002
<i>xrcc5</i>	NAR: 1,000±0,136 AR 1 h: 8,852±1,362 AR 3 h: 5,295±0,969 AR 6 h: 5,186±1,564 AR 24 h: 2,686±0,673	[F(4,18)=5,899;p=0,003] p (NAR- AR 1 h)=0,002	NAR: 1,000±0,076 AR 1 h: 1,057±0,038 AR 3 h: 1,333±0,238 AR 6 h: 1,764±0,397 AR 24 h: 1,026±0,182	[F(4,15)=2,066;p=0,136]
<i>xrcc6</i>	NAR: 1,000±0,156 AR 1 h: 2,606±0,400 AR 3 h: 1,515±0,266 AR 6 h: 1,480±0,111 AR 24 h: 1,400±0,111	[F(4,20)=6,398;p=0,002] p (NAR- AR 1 h) <0,001	NAR: 1,000±0,233 AR 1 h: 0,573±0,099 AR 3 h: 0,424±0,151 AR 6 h: 0,242±0,071 AR 24 h: 0,778±0,213	[F(4,13)=3,184;p=0,049] p (NAR- AR 6 h)=0,024

<i>DNA PK</i>	NAR: 1,000±0,114 AR 1 h: 5,598±1,793 AR 3 h: 1,676±0,232 AR 6 h: 1,414±0,125 AR 24 h: 0,8425±0,084	[F(4,20)=5,931;p=0,003] p (NAR- AR 1 h)=0,002	NAR: 1,000±0,355 AR 1 h: 0,719±0,194 AR 3 h: 1,674±0,427 AR 6 h: 1,489±0,414 AR 24 h: 1,072±0,045	[F(4,14)=1,722;p=0,201]
<i>DNA Lig IV</i>	NAR: 1,000±0,030 AR 1 h: 1,770±0,152 AR 3 h: 1,209±0,009 AR 6 h: 0,207±0,174 AR 24 h: 0,596±0,004	[F(4,20)32,5;p<0,001] p (NAR- AR 1 h) <0,001 p (NAR- AR 6 h) <0,001 p (NAR- AR 24 h)=0,042	NAR: 1,000±0,460 AR 1 h: 0,822±0,703 AR 3 h: 0,404±0,357 AR 6 h: 0,016±0,065 AR 24 h: 0,388±0,181	[F(4,19)=0,668;p=0,622]
<i>tdp1</i>	NAR: 1,000±0,212 AR 1 h: 6,855±1,830 AR 3 h: 3,252±0,361 AR 6 h: 4,137±0,786 AR 24 h: 1,921±0,359	[F(4,18)=5,629;p=0,004] p (NAR- AR 1 h)=0,001	NAR: 1,000±0,128 AR 1 h: 0,158±0,088 AR 3 h: 0,398±0,106 AR 6 h: 0,170±0,054 AR 24 h: 0,097±0,047	[F(4,10)=17,48;p<0,001] p (NAR- AR 1 h) <0,001 p (NAR- AR 3 h)=0,003 p (NAR- AR 6 h) <0,001 p (NAR- AR 24 h) <0,001
<i>tdp2</i>	NAR: 1,000±0,141 AR 1 h: 5,940±1,914 AR 3 h: 1,539±0,186 AR 6 h: 1,496±0,122 AR 24 h: 0,825±0,099	[F(4,17)=4,974;p=0,008] p (NAR- AR 1 h)=0,009	NAR: 1,000±0,249 AR 1 h: 1,283±0,532 AR 3 h: 1,926±0,826 AR 6 h: 4,473±0,511 AR 24 h: 3,275±0,691	[F(4,12)=4,526;p=0,018] p (NAR- AR 6 h)=0,014

<i>h2ax</i>	NAR: 1,000±0,307 AR 1 h: 9,677±2,498 AR 3 h: 7,898±1,038 AR 6 h: 4,674±1,561 AR 24 h: 2,617±0,708	[F(4,14)=6,624;p=0,003] p (NAR- AR 1 h)=0,002 p (NAR- AR 3 h)=0,012	NAR: 1,000±0,135 AR 1 h: 2,893±0,357 AR 3 h: 7,018±0,776 AR 6 h: 3,867±0,814 AR 24 h: 2,524±0,386	[F(4,11)=16,45;p=0,001] p (NAR- AR 3 h) <0,001 p (NAR- AR 6 h)=0,012
<i>53bp1</i>	NAR: 1,000±0,572 AR 1 h: 4,903±0,672 AR 3 h: 3,755±0,746 AR 6 h: 4,449±0,236 AR 24 h: 3,666±0,589	[F(4,16)=5,537;p=0,005] p (NAR- AR 1 h)=0,001 p (NAR- AR 3 h)=0,027 p (NAR- AR 6 h)=0,004 p (NAR- AR 24 h)=0,033	NAR: 1,000±0,186 AR 1 h: 2,156±0,355 AR 3 h: 1,833±0,875 AR 6 h: 5,727±1,517 AR 24 h: 3,633±1,048	[F(4,10)=4,746;p=0,021] p (NAR- AR 6 h)= 0,007

Tabla ANEXO 8: Resumen del valor estadístico obtenido para la expresión génica en hipocampo y en corteza prefrontal. La tabla muestra el valor promedio ± error de la expresión génica para cada uno de los genes y en cada uno de los tiempos de estudio en hipocampo y en corteza prefrontal. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis de ANOVA de una vía y comparaciones múltiples (con respecto al NAR) para los datos de expresión génica representados en la figura 6. n=3-5 ratones por tiempo. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico.

TABLA ANEXO 9A. Valores de latencia de entrada en la prueba de evitación pasiva en el estudio de la inhibición local de proteínas involucradas en procesos de rotura y reparación del ADN.

OAS	VALOR ENT. (MEDIA±ERROR)	VALOR MCP (MEDIA±ERROR)	VALOR MLP (MEDIA±ERROR)
Random	9,862±0,870	36,776±4,750	46,624±4,036
TDP1	8,080±2,735	22,183±8,347	15,650±2,443
TDP2	9,361±1,323	29,392±6,246	28,508±5,002
H2AX	9,357±1,875	29,300±5,799	7,428±0,881

Tabla ANEXO 9A: Latencias reales de entrada (s) en la prueba de evitación pasiva por sesión. Datos de la media de las latencias de entrada por cada grupo experimental ± error estándar medio. ENT.: Entrenamiento; MCP: Memoria a Corto Plazo; MLP: Memoria a Largo Plazo.

TABLA ANEXO 9B. Valores estadísticos obtenidos del estudio de la inhibición local de proteínas involucradas en procesos de rotura y reparación del ADN en la prueba de evitación pasiva.

OAS	ESTADÍSTICA (MCP-MLP Veces con respecto al ENT.)	ESTADÍSTICA MCP (Veces con respecto al Random)	ESTADÍSTICA MLP (Veces con respecto al Random)
Random	[F(2,60)=27,430; p<0,001] p (ENT.-MCP) p<0,001 p (ENT.-MLP) p<0,001		
TDP1	[F(2,14)=1,570; p=0,243] p (ENT.-MCP) p=0,169 p (ENT.-MLP) p=0,549	p=0,202	p<0,001
TDP2	[F(2,36)=5,842; p=0,006] p (ENT.-MCP) p=0,008 p (ENT.-MLP) p<0,012	p=0,834	p<0,001
H2AX	[F(2,18)=11,600; p<0,001] p (ENT.-MCP) p=0,002 p (ENT.-MLP) p<0,899	p=0,908	p<0,001

Tabla ANEXO 9B: Valores estadísticos obtenidos para la figura 8. La tabla muestra el valor estadístico obtenido de las veces la latencia de entrada del entrenamiento mediante el análisis de ANOVA de una vía y comparaciones múltiples. Por un lado (columna 2), los valores de las veces la latencia de entrada del entrenamiento en la evaluación de la MCP y la MLP, cada grupo experimental con respecto al valor obtenido para su entrenamiento; y por otro (columnas 3 y 4) los valores en estas sesiones con respecto al grupo Random. ENT.: Entrenamiento; MCP: Memoria a Corto Plazo; MLP: Memoria a Largo Plazo.

TABLA ANEXO 9C. Valores estadísticos obtenidos del estudio de la expresión de los genes involucrados en procesos de rotura y reparación del ADN bloqueados mediante OASs previo a una sesión de exploración de un nuevo contexto enriquecido.

EXPRESIÓN GÉNICA	RELACIÓN AR/NAR OAS Random (MEDIA ± ERROR)	RELACIÓN AR/NAR OAS Específicos (MEDIA ± ERROR)		VALOR ESTADÍSTICO
<i>tdp1</i>	1,980±0,319	OAS TDP1	0,810±0,222	p=0,015
<i>tdp2</i>	2,475±0,218	OAS TDP2	1,299±0,104	p<0,001
<i>h2ax</i>	4,355±1,008	OAS H2AX	1,418±0,672	p=0,027

Tabla ANEXO 9C: Resumen de los valores de expresión génica obtenidos tras una sesión de ambiente rico con administración previa de OAS en el hipocampo de ratones. La tabla muestra el valor promedio ± error de la expresión génica representado como el cociente de expresión obtenida AR/NAR para cada uno de los genes con OAS Random y el específico de bloqueo. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis t- Student para muestras con varianzas desiguales, representados en la figura 7E. n=5-8 ratones por tiempo. NAR: No Ambiente Rico; AR: Ambiente Rico; OAS: Oligonucleótidos AntiSentido.

TABLA ANEXO 10. Valores estadísticos del estudio anatómico del cerebro de ratones silvestres y mutantes nulos para H2AX.

	H2AX^{+/+}	H2AX^{-/-}	ESTADÍSTICA
PESO (g) (MEDIA±ERROR)	34,240±0,886	27,820±0,739	p <0,001
% ÁREA HIPOCAMPO (MEDIA±ERROR)	6,391±0,535	6,826±0,539	p =0,597
% ÁREA AMÍGDALA (MEDIA±ERROR)	1,241±0,061	1,801±0,088	p =0,006
% ÁREA VENTRÍCULO (MEDIA±ERROR)	0,543±0,114	0,789±0,063	p =0,133

Tabla ANEXO 10: Resumen del valor estadístico obtenido para el peso y para el estudio anatómico del cerebro de ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}. La tabla muestra el valor promedio ± error del valor del peso y del porcentaje del área ocupada por el hipocampo, la amígdala y el ventrículo central, en relación al tamaño del cerebro. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis de t-Student para los datos representados en la figura 1. n=11 ratones por genotipo para el estudio del peso; para el estudio de la morfología: 3 ratones del genotipo H2AX^{+/+}, y 5 ratones del genotipo H2AX^{-/-}.

TABLA ANEXO 11. Valores estadísticos del estudio morfológico específico de neuronas maduras del hipocampo y la amígdala en el cerebro de ratones silvestres y mutantes nulos para H2AX.

	H2AX^{+/+}	H2AX^{-/-}	ESTADÍSTICA
Densidad Cbn+ (células/mm²) (MEDIA±ERROR)	0,008±0,0003	0,009±0,0007	p =0,307
% ÁREA SOMAS (MEDIA±ERROR)	4,261±0,200	3,483±0,246	p =0,049
% ÁREA DENDRITAS (MEDIA±ERROR)	11,816±0,199	9,852±0,545	p =0,015
% ÁREA AXONES (MEDIA±ERROR)	5,573±0,925	6,449±0,969	p =0,537

Tabla ANEXO 11: Resumen del valor estadístico obtenido para la densidad celular Cbn+ y el porcentaje de área ocupada por la capa granular (somas), molecular (dendritas) y de las fibras musgosas (axones) en el giro dentado del hipocampo de ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}. La tabla muestra el valor promedio ± error de la cuantificación del número de células positivas para calbindina (Cbn+) por área (mm²) y el porcentaje de área ocupada correspondiente a los somas, las dendritas y los axones de las células Cbn+ en relación al tamaño del hipocampo, para ambos genotipos. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis de t-Student para los datos representados en la figura 2. n=3 para H2AX^{+/+}; n=5 para H2AX^{-/-}.

TABLA ANEXO 12. Valores estadísticos del estudio sináptico de excitación/inhibición en el hipocampo, en la corteza prefrontal y en la amígdala del cerebro de ratones silvestres y mutantes nulos para H2AX.

BALANCE EXCITACIÓN/INHIBICIÓN			
(Intensidad de fluorescencia PSD95/ Gefirina)	H2AX^{+/+}	H2AX^{-/-}	ESTADÍSTICA
CPF	0,877±0,112	0,914±0,066	p=0,767
Dendritas GD	0,549±0,057	0,734±0,068	p=0,059
<i>Stratum Radiatum</i>	0,596±0,062	0,901±0,100	p=0,020
Amígdala	0,858±0,081	1,067±0,107	p=0,140

Tabla ANEXO 12: Resumen del valor estadístico obtenido para la cuantificación del balance excitación/inhibición en diferentes áreas cerebrales de ratones H2AX^{+/+} y H2AX^{-/-}. La tabla muestra el valor promedio ± error de la cuantificación del balance excitación/inhibición dado por la relación de la intensidad de fluorescencia para PSD95/Gefirina. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis de t-Student para los datos representados en la figura 3. n=3 para H2AX^{+/+}; n=5 para H2AX^{-/-}. CPF: Corteza PreFrontal; GD: Giro Dentado

EVALUACIÓN	PRUEBA	VALORES: MEDIA±ERROR (n)		VALOR ESTADÍSTICO
		H2AX ^{+/+}	H2AX ^{-/-}	
MOTOR	Actividad motora en campo abierto (actividad/min)	Día 1: Min 1: 99,800±8,850 Min 2: 81,100±8,120 Min 3: 77,100±8,590 Min 4: 75,500±9,520 Min 5: 78,800±9,940 Min 6: 74,400±8,320 Min 7: 64,900±6,530 Min 8: 65,300±6,920 Min 9: 75,800±8,440 Min 10: 72,900±7,860 Min 11: 66,500±8,300 Min 12: 62,500±6,820 Min 13: 67,100±7,340 Min 14: 62,800±6,850 Min 15: 46,000±6,960 (n=11)	Día 1: Min 1: 90,500±7,330 Min 2: 85,400±6,320 Min 3: 73,700±6,410 Min 4: 80,200±5,190 Min 5: 68,600±4,850 Min 6: 66,600±7,580 Min 7: 73,600±5,450 Min 8: 75,000±6,460 Min 9: 76,600±5,140 Min 10: 70,500±5,060 Min 11: 63,100±6,540 Min 12: 57,300±5,620 Min 13: 60,700±5,810 Min 14: 58,900±5,170 Min 15: 49,500±7,460 (n=11)	Día 1: p(Min 1=0,429) p(Min 2=0,682) p(Min 3=0,757) p(Min 4=0,667) p(Min 5=0,368) p(Min 6=0,500) p(Min 7=0,336) p(Min 8=0,316) p(Min 9=0,934) p(Min 10=0,802) p(Min 11=0,747) p(Min 12=0,564) p(Min 13=0,504) p(Min 14=0,653) p(Min 15=0,738)
		Día 2: Min 1: 66,600±9,420 Min 2: 60,300±8,480 Min 3: 64,900±6,580 Min 4: 57,000±7,900 Min 5: 61,900±6,640 (n=11)	Día 2: Min 1: 70,200±8,920 Min 2: 61,500±6,450 Min 3: 54,000±5,970 Min 4: 66,600±4,450 Min 5: 56,900±8,110 (n=11)	Día 2: p(Min 1=0,905) p(Min 2=0,906) p(Min 3=0,233) p(Min 4=0,289) p(Min 5=0,638)
	Fuerza muscular (N/g)	0,080±0,002 (n=8)	0,088±0,003 (n=5)	p=0,064

			<p>Sesión 1: 8,730±0,860 Sesión 2: 7,730±1,160 Sesión 3: 7,090±1,370 Sesión 4: 5,000±1,009 Test: 5,270±1,080 (n=11)</p>	<p>Sesión 1: 7,170± 1,26 Sesión 2: 6,080±1,300 Sesión 3: 4,580±1,250 Sesión 4: 4,330±1,120 Test: 4,000±1,270 (n=12)</p>	<p>p(Sesión1=0,3273) p(Sesión2=0,3607) p(Sesión3=0,1914) p(Sesión4=0,6655) p(Test=0,4584)</p>
			<p>47,5°C: 21,440±1,800 50°C: 11,110±0,940 52,5°C: 7,650±0,700 (n=12)</p>	<p>47,5°C: 26,700±1,710 50°C: 13,060±1,800 52,5°C: 7,590±0,940 (n=12)</p>	<p>p(47,5°C)=0,045 p(50°C)=0,347 p(52,5°C)= 0,956</p>
SENSIBILIDAD	Respuesta acústica a estímulos de diferente intensidad	Latencia al inicio (ms)	<p>75dB: 8,492±1,104 85dB: 10,875±0,935 95dB: 11,616±1,333 105dB: 10,154±0,729 115dB: 10,000±1,014 120dB: 9,942±0,878 (n=11)</p>	<p>75dB: 8,625±1,807 85dB: 8,200±1,704 95dB: 10,800±1,944 105dB: 8,130±0,681 115dB: 9,633±1,450 120dB: 8,975±0,962 (n=11)</p>	<p>p(75dB)=0,950 p(85dB)=0,182 p(95dB)=0,732 p(105dB)=0,058 p(115dB)=0,837 p(120dB)=0,465</p>
		Latencia al pico (ms)	<p>75dB: 40,516±2,226 85dB: 43,175±3,169 95dB: 46,675±2,575 105dB: 43,033±4,202 115dB: 32,417±3,002 120dB: 31,733±2,923 (n=11)</p>	<p>75dB: 43,150±3,101 85dB: 39,591±2,335 95dB: 46,266±2,374 105dB: 43,241±3,061 115dB: 39,142±3,128 120dB: 39,433±3,624 (n=11)</p>	<p>p(75dB)=0,497 p(85dB)=0,372 p(95dB)=0,908 p(105dB)=0,968 p(115dB)=0,135 p(120dB)=0,112</p>
		Respuesta máxima, amplitud del pico (Fuerza, mN)	<p>75dB: 8,890±3,084 85dB: 7,840±2,936 95dB: 12,178±3,995 105dB: 17,618±4,013 115dB: 30,621±5,868 120dB: 42,376±8,829 (n=11)</p>	<p>75dB: 9,028±3,151 85dB: 8,135±1,994 95dB: 6,556±1,730 105dB: 6,211±2,073 115dB: 7,263±1,946 120dB: 9,629±3,177 (n=11)</p>	<p>p(75dB)=0,976 p(85dB)=0,935 p(95dB)=0,211 p(105dB)=0,020 p(115dB)=0,001 p(120dB)=0,002</p>

ANSIEDAD	Test de emergencia (Tiempo en la periferia, s)		76,222±1,780 (n=9)	78,969±1,800 (n=11)	p=0,301
	Laberinto en cruz elevado	% Tiempo en brazos cerrados y abiertos	Brazos cerrados: 89,788±1,629 Brazos abiertos: 6,182±1,367 (n=11)	Brazos cerrados: 87,545±2,711 Brazos abiertos: 7,182±1,978 (n=11)	p(Brazos cerrados)=0,486 p(Brazos abiertos)=0,682
		#Entradas a brazos cerrados y abiertos	Brazos cerrados: 11,545±1,115 Brazos abiertos: 1,818±0,569 (n=11)	Brazos cerrados: 11,182±1,068 Brazos abiertos: 2,818±0,615 (n=11)	p(Brazos cerrados)=0,816 p(Brazos abiertos)=0,247
	Enterramiento de canicas (#Canicas Enterradas)		3,750±0,750 (n=5)	2,500±0,500 (n=2)	p=0,3440
DEPRESIÓN	Nado forzado (Tiempo de parálisis acumulado, s)		Min 1: 16,200±3,490 Min 2: 32,300±5,600 Min 3: 49,200±7,780 Min 4: 69,100±9,674 Min 5: 83,500±11,231 (n=11)	Min 1: 20,500±3,260 Min 2: 42,700±5,100 Min 3: 69,600±6,560 Min 4: 93,900±8,250 Min 5: 119,000±8,530 (n=11)	p(Min 1=0,379) p(Min 2=0,1876) p(Min 3=0,0617) p(Min 4=0,0685) p(Min 5=0,0225)
	Preferencia a sacarosa (% Volumen total ingerido)		70,810±4,503 (n=5)	39,040±8,172 (n=2)	p=0,0147
CONDUCTA SOCIAL	Sociabilidad: Tiempo en cada compartimento (F: Familiar; N: Neutro; E: Extraño) (s)	Sesión Habitación	F: 137,100±15,010 N: 47,100±3,840 E: 115,800±15,090 (n=9)	F: 128,900±20,720 N: 44,600±6,800 E: 126,600±19,080 (n=9)	p(F)=0,752 p(N)=0,748 p(E)=0,664

		Sesión Familiar	F: 114,700±9,610 N: 51,900±7,400 E: 133,400±11,9 (n=9)	F: 136,300±19,230 N: 39,800±10,250 E: 124,000±14,770 (n=9)	p(F)=0,315 p(N)=0,345 p(E)=0,623	
		Sesión Extraño	F: 93,700±8,570 N: 50,000±5,520 E: 156,300±13,030 (n=9)	F: 109,000±13,040 N: 46,200±7,840 E: 144,800±11,690 (n=9)	p(F)=0,340 p(N)=0,699 p(E)=0,519	
		Sesión Familiar + Extraño	F: 105,800±11,340 N: 24,000±5,280 E: 170,200±11,660 (n=9)	F: 156,000±22,660 N: 34,000±7,320 E: 110,000±24,290 (n=9)	p(F)=0,065 p(N)=0,284 p(E)=0,025	
	Sociabilidad: Índice de preferencia de interacción social	Sesión Habitación	6,200±8,930 (n=9)	-15,200±9,930 (n=9)	p=0,134	
		Sesión Familiar	18,200±9,110 (n=9)	11,400±4,620 (n=9)	p=0,529	
		Sesión Extraño	53,800±13,080 (n=9)	54,000±14,800 (n=9)	p=0,991	
		Sesión Familiar + Extraño	26,400±6,260 (n=9)	-22,200±18,970 (n=9)	p=0,036	
	Formación del nido (g de material no utilizado)		0 h: 1,000±0,000 1 h: 0,400±0,200 2 h: 0,100±0,133 4 h: 0,000±0,000 6 h: 0,000±0,000 24 h: 0,000±0,000 (n=5)	0 h: 1,000±0,000 1 h: 0,300±0,050 2 h: 0,000±0,000 4 h: 0,000±0,000 6 h: 0,000±0,000 24 h: 0,000±0,000 (n=2)		
	APRENDIZAJE Y MEMORIA	Memoria de trabajo	# Entradas	33,000±1,236 (n=9)	32,500±1,887 (n=10)	p=0,827
			Alternancia espontánea	100±1,083 (n=9)	95,400±1,234 (n=10)	p=0,012

	Cognición sin componente emocional	Índice de discriminación	ENT.: -0,060±0,040 MCP: 0,310±0,070 MLP: 0,410±0,072 (n=8)	ENT.: 0,060±0,045 MCP: 0,010± 0,057 MLP: 0,120±0,098 (n=8)	p(ENT.)=0,078 p(MCP)=0,005 p(MLP)=0,030
	Cognición con componente emocional	Latencia de entrada del entrenamiento (s)	9,118±1,597 (n=11)	12,970±2,663 (n=12)	p(ENT.)=0,239
		Veces latencia del entrenamiento	MCP: 4,500±0,601 MLP: 4,700±0,580 (n=11)	MCP: 3,010±0,388 MLP: 2,720±0,505 (n=12)	p(MCP)=0,045 p(MLP)=0,017

TABLA ANEXO 13: Valores estadísticos del estudio de la caracterización conductual de ratones silvestres y mutantes nulos para H2AX. La tabla muestra los valores promedio ± error (n= número de animales por genotipo) de cada uno de los parámetros analizados en las diferentes conductas para la caracterización de los ratones mutantes y silvestres para H2AX. Además, se muestran los valores estadísticos obtenidos mediante el análisis t-Student para los datos representados en las figuras 12-16. F: Familiar; N: Neutro; E: Extraño; ENT.: Entrenamiento; MCP: Memoria a corto plazo; MLP: Memoria a largo plazo.

ANEXOS (II): Publicaciones

✓ Publicaciones derivadas de la presente tesis doctoral:

L1 retrotransposition alters the hippocampal genomic landscape enabling memory formation. Bachiller, S*, del-Pozo-Martín, Y*, y Carrión AM. *Co-autoras. *Brain, Behavior and Immunity* (2016).

✓ Otras publicaciones:

The HERC1 E3 Ubiquitin Ligase is essential for normal development and for neurotransmission at the neuromuscular junction. Bachiller, S., Rybkina, T., Porrás-García, E., Pérez-Villegas, E., Tabares, L., Armengol, JA., Carrión, AM., y Ruiz, R. *Cellular and Molecular Life Science* (2015).

HERC1 Ubiquitin Ligase mutation affects neocortical, CA3 hippocampal and spinal cord projection neurons: An ultrastructural study. Ruiz, R., Pérez-Villegas, EM., Bachiller, S., Rosa, JL., y Armengol, JA. *Frontiers in Neuroanatomy* (2016).

HERC1 Ubiquitin Ligase controls axon wrapping and myelin sheath thickness throughout Akt. Bachiller, S., Roca-Ceballos, MA., García-Domínguez, I., Pérez-Villegas, EM., Pérez-Castro, MA; Real, LM., Rosa, JL., Tabares, L., Venero, JL., Armengol, JA., Carrión, AM., y Ruiz, R. *En revisión en Glia* (2017).



Contents lists available at ScienceDirect

Brain, Behavior, and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi

Short Communication

L1 retrotransposition alters the hippocampal genomic landscape enabling memory formation

Sara Bachiller¹, Yaiza del-Pozo-Martín¹, Ángel Manuel Carrión^{*}

División de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, Carretera de Utrera Km 1, 41013 Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2016
 Received in revised form 22 November 2016
 Accepted 19 December 2016
 Available online xxx

Keywords:

Memory formation
 LINE1
 Retrotransposition
 Gene expression
 Hippocampus

ABSTRACT

Somatic LINE-1 (L1) retrotransposition is a source of genomic mosaicism and potential phenotypic diversity among neurons during brain development. In the adult brain, L1 expression can be triggered by different environmental alterations, but its functional role in this context remains unknown. Here we demonstrate a neural activation-dependent increase in the number of L1 retrotransposon insertions in the hippocampus. Using both pharmacologic and genetic approaches in mice, we demonstrate that L1 expression in the adult hippocampus enables long-term memory formation. These results provide experimental evidence that L1 retrotransposition-induced genomic mosaicism is involved in cognitive processes such as memory formation.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Transposable elements are a type of mobile DNA repeated sequences that account for almost half of mammalian genome (Lander et al., 2001). Although transposable elements have been related to both physiological and pathological conditions, their role in human health and disease is not fully understood yet (Biémont, 2010). There are two major classes of transposable elements: DNA transposons, generally absent in higher eukaryotes, and RNA transposons, also known as retrotransposons that move throughout genomes via a copy-and-paste mechanism using RNA as an intermediate (Beck et al., 2011). The only active and autonomous elements in mammalian genomes are LINE1s (L1s) and LTR retrotransposons (Beck et al., 2010, 2011; Erwin et al., 2014).

L1 retrotransposition-mediated events in mammals mainly occur in germ cells, but can also be observed in somatic tissues (Muotri et al., 2005; Baillie et al., 2011; Solyom et al., 2012). In the central nervous system, L1 activity has been reported in neuronal precursors (Muotri et al., 2005; Coufal et al., 2009) during the late phase of neuronal differentiation (Muotri et al., 2010), resulting in the re-modelling of the genomic landscape of certain brain areas through intra-individual somatic DNA rearrangements in differentiating neurons (Singer et al., 2010). These findings have sparked the idea that somatic genome variations may contribute to

expanding cellular heterogeneity, and hence, functional diversity in the mammalian brain (Muotri and Gage, 2006; Bushman and Chun, 2013).

To date, although it has been shown that several environmental factors, such as stress (Ponomarev et al., 2010; Hunter et al., 2012), alcohol and cocaine consumption (Ponomarev et al., 2012; Maze et al., 2011), or exercise (Muotri et al., 2009) can alter L1 expression in the adult brain, its functional role in brain physiology remains unknown. Here we demonstrate that L1 retrotransposition is induced in the adult hippocampus in a cognitive-dependent manner contributing to memory formation.

2. Results and discussion

Functional L1s are 6 kb-long DNA sequences containing a single transcript that encodes two proteins: ORF1 (an RNA chaperone protein), and ORF2 (an endonuclease and reverse transcriptase protein). Upon translation, the L1 RNA assembles with its own encoded proteins and is directed to the nucleus, where the endonuclease makes a single-stranded nick in the genomic DNA and the reverse transcriptase uses the nicked DNA to prime the reverse transcription of the L1 RNA (Wei et al., 2001). As reverse transcription frequently fails in the 5' end, the most common outcome for these retrotransposon insertions is truncated and non-functional L1 insertions in the genome that contain either a segment or the complete sequence of orf2, but lack orf1 (Fig. 1a).

Firstly, we explored whether L1 expression was influenced by changes in neural activation. We measured the expression of orf1

* Corresponding author.

E-mail address: amancar@upo.es (Á.M. Carrión).¹ These authors have contributed equally to this work.

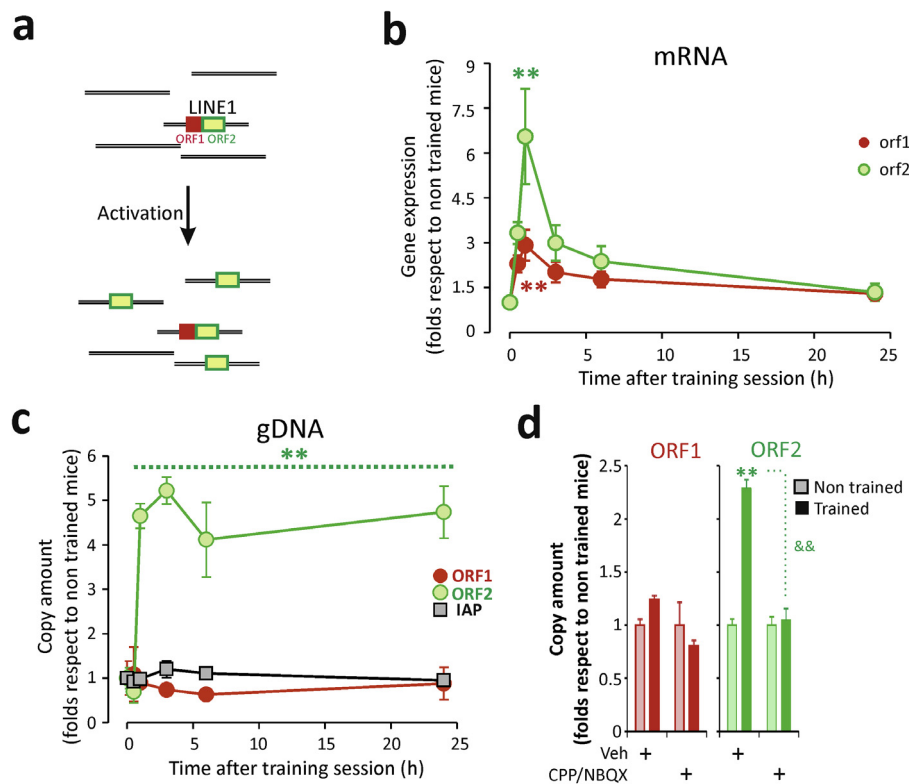


Fig. 1. Novel place exploration induces transient increase in L1 transcription and permanent *de novo* genomic L1 insertion in the hippocampus. **a**, Schematic illustration showing L1 retrotransposition mechanism. Active L1 after activation provokes an increase in the number of defective L1 insertion containing only the ORF2 sequence. **b**, Semiquantitative RT-PCR analysis of *orf1* and *orf2* RNA transcription in the hippocampus at different times after the end of a novel exploratory session. **c**, Semiquantitative PCR estimation of genomic L1 and IAP insertions in the hippocampus of non-manipulated mice and mice killed at several times after exploration session end. **d**, Estimation of ORF1 and ORF2 insertions in the hippocampus of non-trained and trained mice treated with vehicle or CPP/NBQX a cocktail to inhibit glutamatergic transmission, before a novel exploratory session. At least 4 mice per group was analyzed. * and ** represent statistical difference between non-trained and trained mice and between trained mice treated with vehicle and those trained mice treated with drugs, respectively. One symbol, $p < 0.05$; and two symbols, $p < 0.01$.

and *orf2* in the hippocampus of non-manipulated mice, or mice exposed to a novel environment (a manipulation that induces new protein synthesis in a neuronal activity dependent manner in the hippocampus (Moncada and Viola, 2007), and killed 0.5, 1, 3, 6 and 24 h after. Semiquantitative PCR expression analysis revealed a fast and transient increase of *orf1* and *orf2* RNA in the hippocampus of mice killed 1 h after the exploration session (for *orf1*: $F(24,5) = 4.95$, $p = 0.002$; and for *orf2*: $F(24,5) = 7.01$, $p = 0.001$; Fig. 1b). From the same experimental groups described above, we extracted hippocampal genomic DNA to estimate via semiquantitative PCR whether a novel exploratory session would alter the number of ORF1 and ORF2 insertions in the hippocampal genome. Whereas novel exploration did not change the amount of ORF1 insertions in the hippocampus ($F(24,5) = 0.24$, $p = 0.94$), a permanent increase in the amount of ORF2 insertions was observed as from 1 h after the exploratory session ($F(24,5) = 24.00$, $p < 0.001$; Fig. 1c). In addition, to assess whether this *de novo* retrotransposition activity was L1 specific, we measured the number of Intracisternal A-Particle Retrotransposon (IAP) insertions, a LTR retrotransposon. No changes were detected in IAP insertion levels in the hippocampal genome of those mice that undertook the exploratory session ($F(24,5) = 1.07$, $p = 0.39$; Fig. 1c). Interestingly, the increase in ORF2 insertions was prevented in mice treated with glutamatergic antagonist cocktail (CPP, 5 mg/kg, i.p.; and NBQX, 1 mg/kg, i.p.) before the exploratory session ($F(8,3) = 28.98$, $p < 0.001$; Fig. 1d). These results corroborate that L1 retrotransposition occurs in the adult hippocampus after novel exploration.

As with novel exploration, memory formation relies on both changes in synaptic plasticity as well as new protein synthesis (Kelleher et al., 2004; Inda et al., 2005; Romero-Granados et al., 2010), therefore we next decided to examine the potential role of L1 activation in learning and memory processes. Retrotranscriptase inhibitors such as lamivudine block retrotransposition *in vitro* (Jones et al., 2008), but their specificity for L1 have not been determined yet. In cell culture assays, lamivudine blocks specifically L1 insertion without affecting IAP retrotransposition (JL García-Pérez, personal communication, June 2016). *In vivo*, systemic administration of lamivudine (10 mg/kg, i.p.) to mice just after a novel exploratory session blocked *de novo* L1 insertions ($F(20,3) = 25.87$, $p < 0.001$; Fig. 2a).

To determine whether L1 retrotransposition is required for learning (information acquisition) mice were systemically treated with lamivudine just after a passive avoidance (PA) training session, thereby eliminating L1 retrotransposition in the early learning phase. When short-term memory (STM), as a measurement for learning evidence, was assessed 1 h after the PA training session, no differences were found in the escape latency values of the vehicle- and lamivudine-treated mice (treatment effect: $F(28,3) = 0.51$, $p < 0.47$; Session effect: $F(28,3) = 81.77$, $p < 0.001$; Fig. 2b). In contrast, the same lamivudine treatment impaired long-term memory (LTM) formation assessed 72 h after training (treatment effect: $F(20,3) = 14.74$, $p = 0.001$; session effect: $F(20,3) = 13.93$, $p = 0.001$; Fig. 2c). Notably, lamivudine administration just after an exploratory session did not affect the exploratory-dependent induction of *c-Fos* and *Egr1* ($p = 0.68$ and $p = 0.08$ for

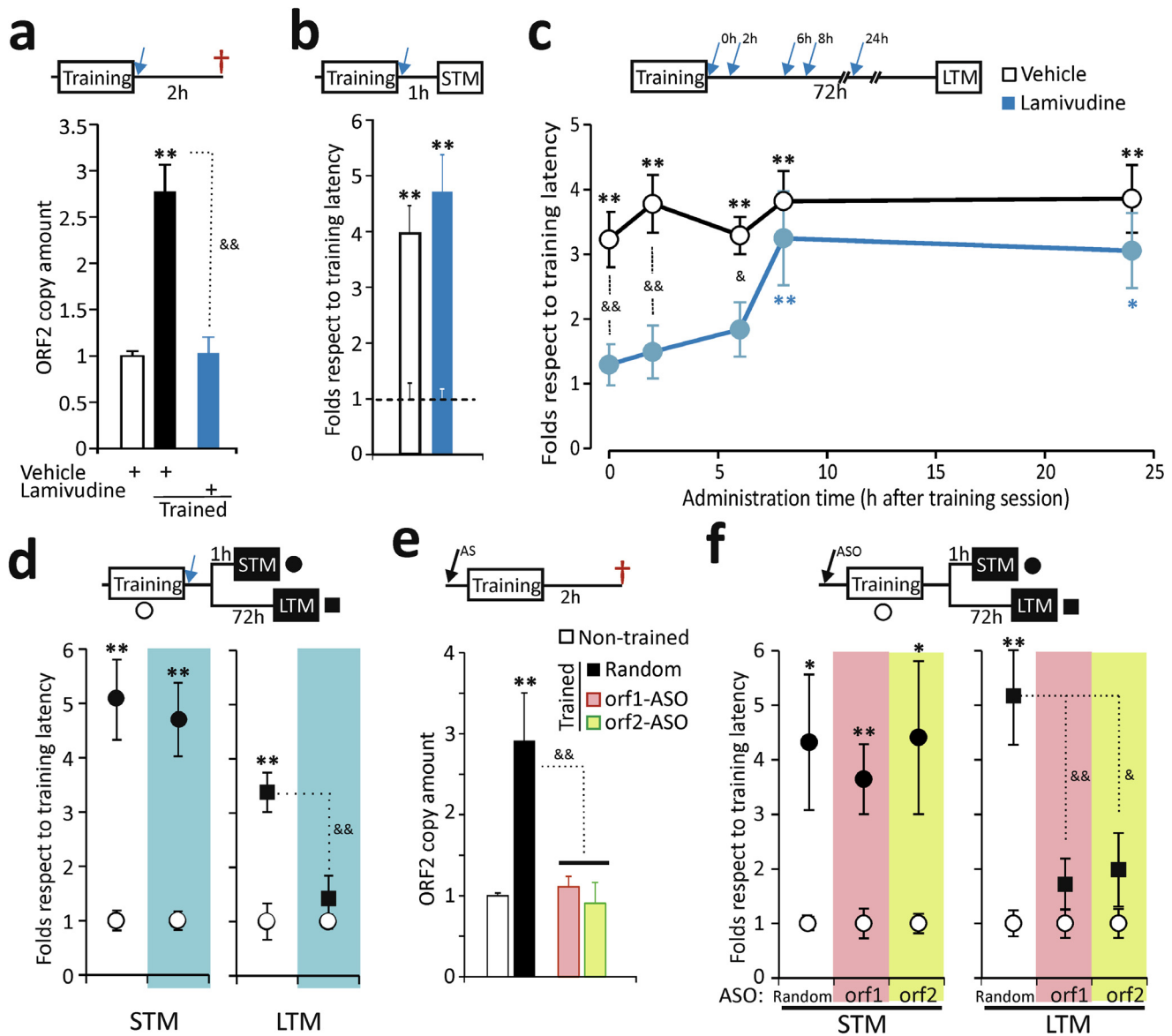


Fig. 2. Pharmacological and genetic L1 retrotransposition inhibition in the hippocampus impairs LTM formation. **a**, Effect of lamivudine, a retrotranscriptase inhibitor, on exploratory-induced *de novo* L1 genomic insertions in the hippocampus. Mice were treated with vehicle or lamivudine (10 mg/kg) after a novel context session, and the amount of ORF2 insertion two hours after exploratory session was quantified by PCR, and compared with respect to non-manipulated mice treated with vehicle or lamivudine. As results were similar in vehicle- and lamivudine-treated mice for the untrained groups, the data were combined. **b**, Effect of lamivudine on passive avoidance (PA) learning. Vehicle or lamivudine were systemically injected just after PA training session, and short-term memory formation assessed 1 h after was used as learning index. Dash line represents the normalized value of training latency in vehicle- and lamivudine- injected mice. **c**, The temporal requirement of L1 retrotransposition on long-term memory (LTM) formation, measured 72 h after training session, was evaluated by administration of lamivudine at different times after training session. **d**, Effect of intrahippocampal lamivudine administration on PA learning and LTM formation. Vehicle or lamivudine were administrated into the hippocampus just after PA training session and their effect on STM and LTM were tested 1 h or 72 h after training session, respectively. **e**, Hippocampal orf1 and orf2 knock down effect on exploratory-induced *de novo* L1 insertions in the hippocampus. Intrahippocampal infusion of ASOs designed against orf1 and orf2 was injected 0.5 h before a 15 min exploration session. PCR semiquantification of L1 insertion was tested in the hippocampus of mice killed 2 h after exploratory session. As results were similar in random- and the different ASOs-injected mice in non-trained mice, these groups are unified. **f**, Hippocampal orf1 and orf2 ASOs effect on PA learning and LTM formation. ASOs were administrated into the hippocampus 0.5 h before of PA training session, and STM and LTM test were evaluated 1 h or 72 h after training session, respectively. The number of mice per group was at least 4 and 7 for molecular and behavioral analysis, respectively. * and & represent statistical difference between non-trained and trained mice and between trained mice treated with vehicle and those trained treated with lamivudine, respectively. A symbol, $p < 0.05$; and two symbols, $p < 0.01$.

c-Fos and Egr1 inducibility respectively; Fig. S1), two Immediate Early Genes (IEGs) used to determine neuronal circuit activation (Guzowski et al., 2005). This result suggests that L1 retrotransposition is not linked to early gene expression, and supports the situation of its temporal activity after IEGs expression. To assess the temporal relationship between retrotransposition and LTM formation, we performed a time course experiment where mice were systemically treated with lamivudine 2, 6, 8 or 24 h after the training session. Only those mice that received lamivudine 2 and 6 h after the training session showed poor LTM formation, whereas

those treated 8 or 24 h after training did not show any impairments (treatment effect: $F(50,9) = 21.95$, $p < 0.001$; and time effect: $F(50,9) = 2.89$, $p = 0.03$; Fig. 2c). These temporal data suggest that lamivudine effect is not due to a drug effect on sensory or motor systems. To confirm whether the observed LTM impairments after blocking retrotransposition were due to changes in hippocampal L1 activity, we performed local intra-hippocampal infusion of lamivudine just after the training session (Fig. S2a). This protocol did not affect learning ($F(24,3) = 0.12$, $p = 0.72$), but a clear impairment of LTM formation was observed (treatment-session interaction:

$F(24,3) = 8.71$, $p = 0.006$; Fig. 2d). Lastly, as L1 mobilization requires both *orf1* and *orf2* expression, we designed AntiSense Oligonucleotides (ASOs) against these genes and performed intra-hippocampal injections 0.5 h before a novel exploration session (Fig. S2b). Both ASOs efficiently blocked the *de novo* L1 insertions induced by exploration ($F(20,3) = 28.38$, $p < 0.001$ and $F(20,3) = 20.70$, $p < 0.001$ for *orf1* and *orf2* ASOs, respectively; Fig. 2e). At the behavioral level, while infusion of *orf1* and *orf2* ASOs did not affect STM ($F(36,5) = 0.01$, $p = 0.98$), LTM formation was impaired in the PA paradigm (ASOs-session interaction: $F(42,5) = 6.7$, $p < 0.002$; Fig. 2f). Remarkably, similar results were obtained when L1 expression was manipulated within the same temporal window in novel object recognition behavioral tests (Fig. S3). Altogether, these results show that *de novo* L1 retrotransposition contributes to learning and early memory acquisition in a temporally controlled manner (up to 6 h after training) to ensure LTM formation.

Two waves of *de novo* protein synthesis are required for LTM formation (Freeman et al., 1995; Quevedo et al., 1999; Igaz et al., 2002). In the first wave the expression of immediately-early genes (IEG)-encoded effector proteins seems to be required for learning codification, alongside transcription factors such as c-Fos and *Egr1*. In the second wave, proteins involved in signaling transduction pathways, synaptic transmission, and cell communication (Benito et al., 2011 and Lacar et al., 2016) induced by the transcription factors encoded by IEGs, are involved in LTM formation. However, it is not known how this transient genetic program sustains the lasting processes associated with LTM. In this context, L1 retrotransposon insertions may contribute to LTM formation generating cells with unique genomes and, consequently, with long-lasting distinct transcriptomes by altering proximal gene expression and RNA splicing, and by causing premature polyadenylation of RNA (revised in Erwin et al., 2014).

Recently, using single-cell retrotransposon capture sequencing on individual neurons demonstrated that L1 insertions occur in hippocampal neurons, specifically in hippocampus-active genes involved in different synaptic processes (Upton et al., 2015). These intriguing results suggest the functional relevance of L1 retrotransposition-mediated effects in hippocampal synaptic processes.

It was previously shown that L1 expression is induced in the adult brain upon environmental alterations or in disease (Reilly et al., 2013), and an increase in neuronal L1 insertions is observed in brain pathological conditions such as schizophrenia and Rett syndrome (Muotri et al., 2010; Bundo et al., 2014). Here, we demonstrate that physiologic neural activation in the hippocampus increases both L1 expression and retrotransposition. Moreover, using different cognitive paradigms to evaluate physiological hippocampal activation, we show for the first time the functional role of L1 retrotransposition in memory formation.

Our data indicate that while L1 retrotransposition is postulated to generate neuronal diversity by creating genomic mosaicism during central nervous system development, in the adult brain, combinations of L1 insertions in individual neurons, still to be determined, may contribute to the storage of LTM trace.

3. Conclusion

Using independent cognitive paradigms to evaluate physiological hippocampal activation in wild type mice, our work demonstrates that L1 retrotransposition and *de novo* L1 insertions occur in the adult hippocampus. Moreover, here we show that physiological neural activation during memory formation in the hippocampus relies on L1 retrotransposition, providing first evidence for its functional role in the adult brain.

4. Materials and methods

4.1. Animals

Male Swiss mice (8 weeks-old) were purchased from an authorized provider (University of Seville, Seville-Spain, or Janvier, France) and habituated to standard animal housing conditions for 2–3 weeks (a 12 h light/dark cycle, temperature and humidity). Behavioral studies were done with 10–12 weeks old mice. All experiments were performed in accordance to European Union guidelines (2010/63/EU) and Spanish national regulations for the use of laboratory animals in chronic experiments (BOE 67/8509-12, 1988), adhering to the ARRIVE guidelines. Ethical approval for this study was obtained from the University Pablo de Olavide animal care committee.

4.2. Cannulation and drug infusion

Mice were anesthetized with 4% chloral hydrate solution (10 $\mu\text{L}/\text{kg}$ of body weight, injected intraperitoneally) and when fully anesthetized, they were situated in a stereotactic frame. For the hippocampus cannulation, the stereotactic coordinates used were: AP = -2.06 mm, ML = ± 1.5 mm, V = -1.2 mm from the Bregma. The mice were then allowed to recover for at least 15 days. To inactivate L1 retrotransposition 0.5 μL (delivered at a rate of 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$) of lamivudine (100 μM) or antisense phosphotioated oligonucleotides (3 mM) were bilaterally guided through the cannulae into the dorsal region of the hippocampus of mice. The antisense complementary sequences to the ORF1 and ORF2 of L1 were 5'-T*T*T*GCCTTCGCCATCTGG*T*A*-3' and 5'-T*G*T*TAGAGTTGGCATTCTG*T*T*-3', respectively [* , phosphotioated residues]. The Hamilton injection syringe was left in place for 1 min following infusion to ensure complete treatment delivery.

4.3. Step-through passive avoidance (PA) test

Mice have an innate preference for dark and enclosed environments. During the habituation phase, mice were handled and allowed to move freely for 1 min in a chamber ($47 \times 18 \times 26$ cm, manufactured by Ugo Basile) that is divided symmetrically into one light and one dark compartment (each measuring $28.5 \text{ cm} \times 18 \text{ cm} \times 26 \text{ cm}$). During the training phase, mice were briefly confined to the light compartment and then 30 s later, the door separating the dark-light compartments was opened. Once mice entered the dark compartment, the door was closed automatically and the mice received an electrical stimulation (0.5 mA, 5 s) delivered through the metal floor. In the retention tests performed at the times indicated, mice that recalled the electrical shock experience when re-placed in the light compartment avoided, or at least took longer, to enter the dark compartment. Thus, the latency to enter into the dark compartment (escape latency) is a measure of information learning or memory retention depending on how long after the training session the test was carried out. In order to compare the results obtained in different experiments, the fold change in escape latency with respect to the latency obtained in the training session is represented.

4.4. Nucleic acid extraction and PCR analysis

Hippocampus from mice killed 0.5, 1, 3, 6 and 24 h after a 15 min novel exploratory session, and control mice exclusively handled in a familiar environment (non-manipulated mice) were obtained. Total RNA and genomic DNA were extracted using Tri-pure reagent (Roche Products, Hertfordshire, UK). A minimum of

four animals per group were used per assay. To quantify ORF1 and ORF2 transcription, we performed semiquantitative PCR experiments using the following PCR primers: ORF1, 5'-AGGCTACTA TACCCGGCCAAA-3' and 5'-CTTTCTTGGTTGTCTAGGGC-3'; ORF2, 5'-CCATGCTCATGGATTCC-3' and 5'-ATTCTATTCCATTGGTCTA-3'. Arbitrary units were computed as the ratio between the optical density of the band corresponding to the gene studied in the 20–30th cycle, and that of the housekeeping gene (*gadph*) in the 15th amplification cycle. To estimate the amount of genomic L1 amplification the primers described above and for IAP (5'-GCACCCT CAAAGCCTATCTTAT-3' and 5'-TCCCTTGGTCAGTCTGGATTT-3') were used to amplify 10 ng of gDNA in a PCR reaction. In this case, normalization was performed using genomic *lpl* amplification as a reference (5'-ATCCAAGGGTAGCAGACAGGT-3' and 5'-GGATG GACGGTAAGAGTGATT-3'). In both case, as one unit was considered the ratio corresponding to the gene band:*lpl* band amplified from non-trained mice group.

4.5. Statistical analysis

All results were analyzed using the SPSS package for Windows and unless otherwise stated, the data are represented as the mean \pm SEM values. Data were analyzed performing one-way or two-way ANOVA as required (numerical values included between brackets within the main text), and Student's *t*-test with Tukey's correction (numerical values showed in figure legends) was used for post-hoc comparisons.

Funding

This work was supported by grants from the Fundación Ramón Areces – Spain and DGICYT – Spain (Departamento Gubernamental de Investigaciones Científicas y Tecnológicas: BFU2008-01552 and BFU2011-27207) to AMC. YDPM and SB were supported by the Fundación Ramón Areces fellowships.

Competing interests

The authors have no competing interests to declare.

Authors' contributions

SB and YPM performed the experiments, analyzed data, and contributed to the manuscript preparation. YPM copyedited the manuscript. AMC designed and supervised the study, interpreted data, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Impact statement

Hippocampal activation underlying memory formation in the adult brain relies on L1 retrotransposition

Acknowledgments

We thank Mrs Tatyana Rybkina for her assistance with the animal handling and maintenance; Alejandro Belmonte for his technical assistance; and Dr García-Pérez for his useful comments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.018>.

References

- Baillie, J.K., Barnett, M.W., Upton, K.R., Gerhardt, D.J., Richmond, T.A., De Sapio, F., Brennan, P.M., Rizzu, P., Smith, S., Fell, M., Talbot, R.T., Gustincich, S., Freeman, T. C., Mattick, J.S., Hume, D.A., Heutink, P., Carninci, P., Jeddeloh, J.A., Faulkner, G.J., 2011. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature* 479, 534–537.
- Beck, C.R., Collier, P., Macfarlane, C., Malig, M., Kidd, J.M., Eichler, E.E., Badge, R.M., Moran, J.V., 2010. LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. *Cell* 141, 1159–1170.
- Beck, C.R., García-Pérez, J.L., Badge, R.M., Moran, J.V., 2011. LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 12, 187–215.
- Benito, E., Valor, L.M., Jimenez-Minchan, M., Huber, W., Barco, A., 2011. CAMP response element-binding protein is a primary Hub of activity-driven neuronal gene expression. *J. Neurosci.* 31, 18237–18250.
- Biémont, C., 2010. A brief history of the status of transposable elements: from junk DNA to major players in evolution. *Genetics* 186, 1085–1093.
- Bundo, M., Toyoshima, M., Okada, Y., Akamatsu, W., Ueda, J., Nemoto-Miyauchi, T., Sunaga, F., Toritsuka, M., Ikawa, D., Kakita, A., Kato, M., Kasai, K., Kishimoto, T., Nawa, H., Okano, H., Yoshikawa, T., Kato, T., Iwamoto, K., 2014. Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron* 81, 306–313.
- Bushman, D.M., Chun, J., 2013. The genomically mosaic brain: aneuploidy and more in neural diversity and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Coufal, N.G., García-Pérez, J.L., Peng, G.E., Yeo, G.W., Mu, Y., Lovci, M.T., Morell, M., O'Shea, K.S., Moran, J.V., Gage, F.H., 2009. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* 460, 1127–1131.
- Erwin, J.A., Marchetto, M.C., Gage, Fred H., 2014. Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 497–506.
- Freeman, F.M., Rose, S.P., Scholey, A.B., 1995. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63, 291–295.
- Guzowski, J.F., Timlin, J.A., Roysam, B., McNaughton, B.L., Worley, P., Barnes, C.A., 2005. Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 599–606.
- Hunter, R.G., Murakami, G., Dewell, S., Seligsohn, M., Baker, M.E., Datsun, N.A., McEwen, B.S., Pfaff, D.W., 2012. Acute stress and hippocampal histone H3 lysine 9 trimethylation, a retrotransposon silencing response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 17657–17662.
- Igaz, L.M., Vianna, M.R.M., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2002. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J. Neurosci.* 22, 6781–6789.
- Inda, M.C., Delgado-García, J.M., Carrión, A.M., 2005. Acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of eyelid conditioning responses require de novo protein synthesis. *J. Neurosci.* 25, 2070–2080.
- Jones, R.B., Garrison, K.E., Wong, J.C., Duan, E.H., Nixon, D.F., Ostrowski, M.A., 2008. Nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors differentially inhibit human LINE-1 retrotransposition. *PLoS One* 3, e1547.
- Kelleher 3rd, R.J., Govindarajan, A., Tonegawa, S., 2004. Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44, 59–73.
- Lacar, B., Linker, S.B., Jaeger, B.N., Krishnaswami, S., Barron, J., Kelder, M., Parylak, S., Paquola, A., Venepally, P., Novotny, M., O'Connor, C., Fitzpatrick, C., Erwin, J., Hsu, J.Y., Husband, D., McConnell, M.J., Lasken, R., Gage, F.H., 2016. Nuclear RNA-seq of single neurons reveals molecular signatures of activation. *Nat. Commun.* 19 (7), 11022. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11022>.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Maze, I., Feng, J., Wilkinson, M.B., Sun, H., Shen, L., Nestler, E.J., 2011. Cocaine dynamically regulates heterochromatin and repetitive element unsilencing in nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 3035–3040.
- Moncada, D., Viola, H., 2007. Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *J. Neurosci.* 27, 7476–7481.
- Muotri, A.R., Chu, V.T., Marchetto, M.C., Deng, W., Moran, J.V., Gage, F.H., 2005. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 435, 903–910.
- Muotri, A.R., Gage, F.H., 2006. Generation of neuronal variability and complexity. *Nature* 441, 1087–1093.
- Muotri, A.R., Zhao, C., Marchetto, M.C., Gage, F.H., 2009. Environmental influence on L1 retrotransposons in the adult hippocampus. *Hippocampus* 19, 1002–1007.
- Muotri, A.R., Marchetto, M.C., Coufal, N.G., Oefner, R., Yeo, G., Nakashima, K., Gage, F. H., 2010. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* 468, 443–446.
- Ponomarev, I., Rau, V., Eger, E.I., Harris, R.A., Fanselow, M.S., 2010. Amygdala transcriptome and cellular mechanisms underlying stress-enhanced fear learning in a rat model of posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 35, 1402–1411.
- Ponomarev, I., Wang, S., Zhang, L., Harris, R.A., Mayfield, R.D., 2012. Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *J. Neurosci.* 32, 1884–1897.

- Quevedo, J., Vianna, M.R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I., Rose, S.P.R., 1999. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn. Mem.* 6, 600–607.
- Reilly, M.T., Faulkner, G.J., Dubnau, J., Ponomarev, I., Gage, F.H., 2013. The role of transposable elements in health and diseases of the central nervous system. *J. Neurosci.* 33, 17577–17586.
- Romero-Granados, R., Fontán-Lozano, A., Delgado-García, J.M., Carrión, A.M., 2010. From learning to forgetting: behavioral, circuitry, and molecular properties define the different functional states of the recognition memory trace. *Hippocampus* 20, 584–595.
- Singer, T., McConnell, M.J., Marchetto, M.C., Coufal, N.G., Gage, F.H., 2010. LINE-1 retrotransposons: mediators of somatic variation in neuronal genomes? *Trends Neurosci.* 33, 345–354.
- Solyom, S., Ewing, A.D., Rahrmann, E.P., Doucet, T., Nelson, H.H., Burns, M.B., Harris, R.S., Sigmon, D.F., Casella, A., Erlanger, B., Wheelan, S., Upton, K.R., Shukla, R., Faulkner, G.J., Largaespada, D.A., Kazazian Jr, H.H., 2012. Extensive somatic L1 retrotransposition in colorectal tumors. *Genome Res.* 22, 2328–2338.
- Upton, K.R., Gerhardt, D.J., Jesuadian, J.S., Richardson, S.R., Sánchez-Luque, F.J., Bodea, G.O., Ewing, A.D., Salvador-Palomeque, C., van der Knaap, M.S., Brennan, P.M., Vanderver, A., Faulkner, G.J., 2015. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell* 161, 228–239.
- Wei, W., Gilbert, N., Ooi, S.L., Lawler, J.F., Ostertag, E.M., Kazazian, H.H., Boeke, J.D., Moran, J.V., 2001. Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1429–1439.

Supplemental Material

Inventory of Supplemental Information

Supplemental Figures

Figure S1: Retrotranscriptase inhibition does not alter the expression of early markers of hippocampal neuronal activity.

Figure S2: Intrahippocampal administration experiments.

Figure S3: Pharmacologic and genetic inhibition of L1 retrotransposition impair novel object recognition (ORM) long-term memory formation.

Supplemental data

Table S1. Latency values acquired in the different sessions of passive avoidance experiments showed in main text.

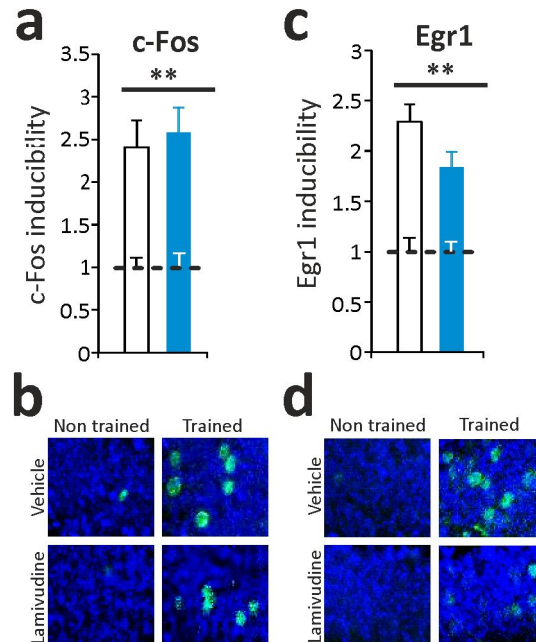
Supplemental Experimental Procedures

Immunohistochemistry, immunofluorescence, and histological analysis performed in the Supplemental Figure S1.

Object recognition test performed in the Supplemental Figure S3.

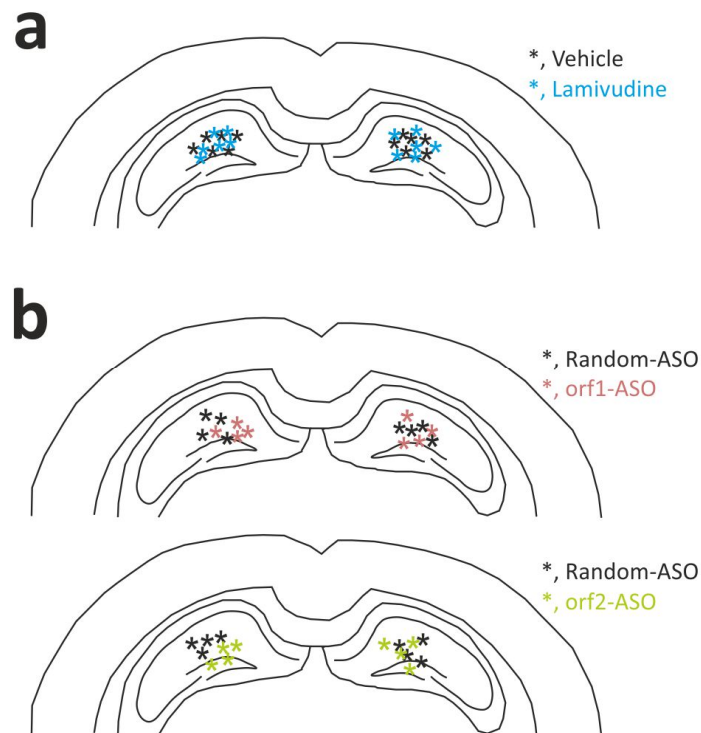
Supplemental Figures

Figure S1.



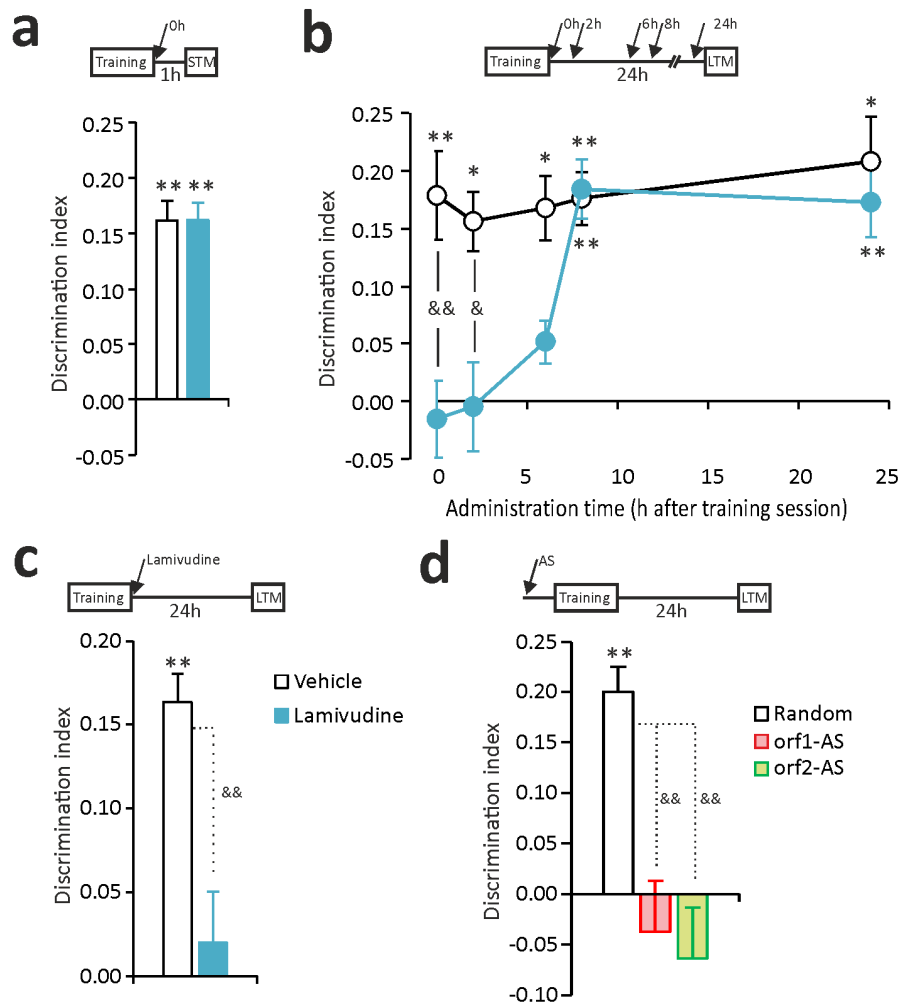
Supplemental Figure S1. Retrotranscriptase inhibitors did not affect the inducibility of early markers of neuronal activity. **a and c**, Quantification of c-Fos (**a**) and Egr1 (**c**) inducibility in the hippocampal dentate gyrus 2h after the end of a 15 minutes novel environment exploratory session. Lamivudine was administered just after the exploration session finished. Dashed line represents normalized basal gene expression levels. White and blue bars represent vehicle- and lamivudine-injected mice, respectively. **b and d**, Representative immunofluorescence images of c-Fos (**b**) and Egr1 (**d**) [green signals] in non-trained or trained mice treated as indicated. n=5 mice per group. **, p<0.01.

Figure S2.



Supplemental Figure S2. Intrahippocampal administration experiments. To block hippocampal L1 retrotransposition, local administration of either vehicle or treatment was performed through cannula guide in the indicated areas. **a**, Representative illustration of the place where cannula were inserted into the hippocampus of six vehicle- or lamivudine-injected mice (black and blue asterisks respectively). **b**, Representative illustration of the place where cannula were inserted into the hippocampus in four mice injected with random, orf1 and orf2 antisense oligonucleotide (ASO; black, red and green asterisks respectively).

Figure S3.



Supplemental Figure 3. Pharmacological and genetic inhibition of L1 retrotransposition impairs novel object recognition (NOR) LTM formation. **a**, Effect of lamivudine on NOR learning. Vehicle or lamivudine (10 mg/kg) were systemically injected just after a NOR training session, and short-term memory formation was assessed 1h after (represented as learning index). **b**, The temporal requirement of L1 retrotransposition in long-term memory (LTM) formation, measured 24h after the training session, was evaluated by administering lamivudine at the indicated times after the training session. **c**, Effect of intrahippocampal lamivudine administration on NOR LTM formation. Vehicle or lamivudine was directly infused into the hippocampus just after a NOR training session. The effect on LTM was tested 24h after the training session. **d**, Effect of hippocampal infusion of orf1 and orf2 ASOs on NOR LTM formation. ASOs were administered into the hippocampus 30 minutes before the NOR training session and LTM was evaluated 24h after. The number of mice

per group was of at least 4 for molecular assays and 7 behavioral analyses, respectively. * represents statistical difference between non-trained and trained mice, and & between trained mice treated with vehicle or the indicated treatment. One symbol, $p < 0.05$; and two symbols, $p < 0.01$.

Supplemental data

Table S1. Latency values acquired in the different sessions of passive avoidance experiments showed in main text.

Figure	Treatment	Training session	STM test
Fig. 2b	Vehicle	11.49±3.23	45.44±5.86
	Lamivudine	9.06±3.23	42.63±6.10
	Treatment	Training session	LTM test
Fig. 2c	Vehicle, 0h	11.04±1.59	34.36±4.49
	Lamivudine, 0h	9.02±1.95	10.92±4.25
	Vehicle, 2h	12.75±4.00	44.66±4.74
	Lamivudine, 2h	10.76±2.51	15.92±4.25
	Vehicle, 6h	14.14±1.41	40.26±4.31
	Lamivudine, 6h	15.30±4.71	27.82±6.25
	Vehicle, 8h	11.99±1.91	36.47±4.30
	Lamivudine, 8h	13.86±2.01	44.12±2.01
	Vehicle, 24h	9.14±1.80	42.85±3.57
	Lamivudine, 24h	7.07±1.80	20.93±3.66
	Treatment	Training session	STM test
Fig. 2d	Vehicle	8.56±1.58	43.36±6.32
	Lamivudine	9.06±1.57	42.63±6.10
	Treatment	Training session	LTM test
	Vehicle	7.03±2.34	22.08±2.60
	Lamivudine	5.99±0.79	8.89±2.63
	Treatment	Training session	STM test
Fig. 2f	Random ASO	8.43±1.19	37.27±10.71
	orf1 ASO	8.65±2.85	36.28±4.59
	orf2 ASO	9.48±1.45	37.72±11.99
	Treatment	Training session	LTM test
	Random ASO	11.58±2.99	57.23±9.63
	orf1 ASO	11.60±3.06	18.37±5.00
	orf2 ASO	11.64±3.40	22.32±7.58

Supplemental Experimental Procedures

Immunofluorescence and histological analysis of c-Fos and Egr1 immunoreactivity

Immunofluorescence (IF) against c-Fos and Egr1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) was performed to assess early activity-dependent neuronal activation after novel context exploration in presence or absence of lamivudine. A minimum of four mice per group were used, and to minimize variability at least four sections from rostral hippocampus (-1.58 to -2.06mm from Bregma) were analyzed per animal. The total number of positively stained cells in the granular layer of the hippocampal dentate gyrus was quantified using Image-J software (freely available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

Object recognition memory test

Mice were tested in a rectangular arena (55×40×40 cm) located in a room with dim lighting and constant background noise. Two identical objects were placed in the arena during the training phase of the object recognition protocol. Subsequently, the animal's memory of one of the original objects was assessed by comparing the amount of time spent exploring the novel object with that spent exploring the familiar one. The objects were plastic pieces of different shapes and they were cleaned thoroughly with 70% ethanol between trials to remove any olfactory cues. Before the experiment, mice were habituated to the arena for 20 minutes in the absence of the objects on 2 consecutive days. On the training day, mice were allowed to explore the two identical objects for 15 minutes. Retention tests were then performed at the times indicated after the training session by returning the mice to the arena for a 10 minutes session having randomly exchanged one of the familiar objects for a novel one. The time spent exploring each object was recorded and the relative exploration of the novel object was expressed as a discrimination index $[DI = (t_{\text{novel}} - t_{\text{familiar}}) / (t_{\text{novel}} + t_{\text{familiar}})]$. The criteria for exploration were based strictly on active exploration, defined as directing the nose toward the object at a distance of ± 1.5 cm and/or touching the object with the nose or vibrissae. Circling or sitting on the object were not considered exploratory behaviors. All trials were performed by an experimenter blind to the drug treatments and/or manipulations.

The HERC1 E3 Ubiquitin Ligase is essential for normal development and for neurotransmission at the mouse neuromuscular junction

S. Bachiller · T. Rybkina · E. Porrás-García · E. Pérez-Villegas · L. Tabares · J. A. Armengol · A. M. Carrión · R. Ruiz

Received: 18 November 2014 / Revised: 15 February 2015 / Accepted: 27 February 2015
© Springer Basel 2015

Abstract The ubiquitin–proteasome system (UPS) plays a fundamental role in protein degradation in neurons, and there is strong evidence that it fulfills a key role in synaptic transmission. The aim of the present work was to study the implication of one component of the UPS, the HERC1 E3 Ubiquitin Ligase, in motor function and neuromuscular transmission. The *tambaleante* (*tbl*) mutant mouse carries a spontaneous mutation in HERC1 E3 Ubiquitin Ligase, provoking an ataxic phenotype that develops in the second month of life. Our results show that motor performance in mutant mice is altered at postnatal day 30, before the cerebellar neurodegeneration takes place. This defect is associated with by: (a) a reduction of the motor end-plate area, (b) less efficient neuromuscular activity *in vivo*, and (c) an impaired evoked neurotransmitter release. Together, these data suggest that the HERC1 E3 Ubiquitin Ligase is fundamental for normal muscle function and that it is essential for neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00018-015-1878-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Bachiller · T. Rybkina · E. Porrás-García · E. Pérez-Villegas · J. A. Armengol · A. M. Carrión · R. Ruiz (✉)
Department of Physiology, Anatomy and Cellular Biology,
University of Pablo de Olavide, Carretera de Utrera Km 1,
41013 Seville, Spain
e-mail: rruizlaza@upo.es

L. Tabares
Department of Medical Physiology and Biophysics,
University of Seville, Seville, Spain

J. A. Armengol
School of Medicine, University of Cartagena de Indias,
Cartagena, Colombia

Keywords Vesicle · Proteasome · Electromyography (EMG) · Ready releasable pool (RRP) · Synapse · Intracellular recording

Introduction

The ligation of ubiquitin molecules to proteins is part of a key degradation pathway that strongly influences their turnover. Protein ubiquitination is the result of a cascade of catalytic reactions driven by the ubiquitin–proteasome system (UPS) involving three main groups of enzymes: E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme), and E3 (ubiquitin-protein ligase) (reviewed by [1, 2]). Several studies have revealed the fundamental role of the neuronal UPS in maintaining the homeostasis of synapses [1–4]. In fact, altering the protein degradation system has been related to neurodegenerative diseases like spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), X-spinal muscular atrophy [5–8], as well as Alzheimer’s, Parkinson’s, and Huntington’s diseases [1, 9–12].

The localization of the UPS at synapses, and its implication in synaptic development, maintenance, and plasticity, has been investigated in invertebrates and vertebrates (for review see [1]). Recent studies show that the UPS plays a key role in neurotransmission at the neuromuscular junction [4, 13, 14]. However, despite the wealth of evidence that the UPS participates in physiological and pathological events in the nervous system, the specific role fulfilled by the different UPS proteins is on the whole unknown. Thus, it is important to better understand how UPS activity affects the behavior of synapses.

The HERC 1 (HECT domain and RCC1 domain) E3 Ubiquitin Ligase is a component of the UPS. It has been reported that the Gly483Glu substitution within this protein

induces protein overexpression and is responsible for the *tambaleante* (*tbl*) phenotype in mice [15]. This phenotype is characterized by a severe ataxia uncoordinated gait, irregular hindlimb posture, and trembling [16–18], and it is associated with progressive Purkinje cell (PC) degeneration that first becomes obvious at about 2 months of age, deteriorating thereafter.

Here, we have studied *tambaleante* mutant mice to determine how the HERC1 E3 Ubiquitin Ligase participates in motor function and neuromuscular transmission. By performing electromyography *in vivo* and through the intracellular recording of postsynaptic muscle potentials *ex vitro*, we demonstrate that HERC1 malfunction produces motor defects prior to the manifestation of the ataxia phenotype and cerebellar cell loss. Hence, this ligase appears not only to be essential for PCs but also for synaptic activity at the neuromuscular junction (NMJ).

Materials and methods

Animal model

Tambaleante mice were kindly provided by Dr. Jose Luis Rosa (Department of Ciències Fisiològiques II, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Spain) and the experimental mice were obtained by breeding pairs of *tbl* carrier mice. Wild-type and mutant mice (*tbl/tbl*) were genotyped by PCR as described previously [15] and the control mice used were age-matched littermates of the mutants. All experiments were performed according to current Spanish legislation RD 53/2013 governing experimental animal care (BOE 08/02/2013).

Motor function tests

To habituate mice to the rotarod (Ugo Basile Biological Research Apparatus), the animals were placed on the roller at a speed of 20 rpm until they could remain on it for one minute without falling off. To assay motor coordination, animals were then tested at a rotational speed of 20 rpm, accelerating to 60 rpm in increments of 5 rpm, and quantifying the number of falls at each increase in speed. Forelimb muscle strength was measured using Digital Force Gauges (Chatillon DFE AMETEK), repeating the measurement five times in each experimental group.

Electrophysiological analysis of the *medial gastrocnemius* (MG) muscle in *tbl* mice

Compound muscular action potentials (CMAPs) were recorded in anesthetized mice (tribromethanol 2 %, 0.15 ml/10 g body weight, *i.p.*) as described previously

[19–21]. Briefly, the recording needle electrode was placed into the medial part of the MG muscle and the reference electrode was situated at the base of the fifth phalanx. A ground electrode was also placed at the base of the tail, and stimulating needle electrodes were placed at the sciatic notch and the head of the fibula. Stimulation protocols of supramaximal current pulses (0.05 ms duration, 5–10 mA amplitude) were applied as a short train of 10, 50, and 100 Hz pulses generated by an isolated pulse stimulator (Pulse Train Stimulator Cibertec cs-20). The outputs recorded were differentially amplified (P511 AC Amplifier Astro-Med, INC), digitally acquired at 10,000 samples/s (CED 1401 Plus; Cambridge Electronic Designed, Cambridge, UK) and stored on a computer for later analysis. The analysis consisted of measuring the amplitude from the positive to the negative peak of the CMAPs recorded during a train of stimuli, normalizing the amplitude to the first response.

Muscle preparation for intracellular recording

Mice were anesthetized with tribromethanol as above and sacrificed by exsanguination. The *Levator Auris Longus* (*LAL*) muscle was dissected out with its nerve branches intact and pinned to the bottom of a 2 ml chamber on a bed of cured silicone rubber (Sylgard, Dow Corning). These preparations were perfused continuously with the following solution (in mM): 125 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, and 30 glucose. This solution was continuously gassed with 95 % O₂ and 5 % CO₂ to maintain its pH at 7.35, and recordings were obtained at room temperature (22–23 °C).

Ex vivo electrical stimulation and intracellular recording

The nerve was stimulated using a suction electrode, applying 0.2 ms square-wave pulses with a 2–40 V amplitude and variable frequency (0.5–100 Hz). Evoke end-plate potentials (EPPs) and miniature EPPs (mEPPs) were recorded as described previously [20, 22–24]. Muscle contractions were blocked with μ -conotoxin GIIIB (2–4 μ M; Alomone Labs), a specific blocker of skeletal muscle voltage-gated sodium channels.

Intracellular recording analysis

The mean EPP and mEPP amplitudes recorded at each NMJ were normalized linearly to a -70 mV resting membrane potential and the EPPs were corrected for non-linear summation [25]. Quantal content (QC) was estimated by the direct method, which consists of simultaneously recording mEPPs and EPPs (0.5 Hz nerve

stimulation) and then calculating the ratio: $QC = \text{average peak EPP} / \text{average peak mEPP}$. The readily releasable pool (RRP) size was estimated as reported previously [26]. Briefly, the QCs obtained during a train were plotted against the cumulative number of quanta and the RRP was estimated by back-extrapolation from the linear portion of the curve to the x-axis intercept. The x-intercept gives an estimate of RRP based upon the assumption of negligible mobilization into the RRP [27, 28].

Immunohistochemistry

To analyze Purkinje cells (PCs), we followed the protocol described previously [29]. Briefly, control and *tbl* mice were sacrificed with an overdose of pentobarbital (80 mg/kg i.p.) and perfused intracardially with 4 % paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). The cerebellum was dissected out and post-fixed by immersion in 4 % fresh fixative solution for 24 h at 4 °C. The tissue was then cryoprotected in 30 % sucrose-PBS at 4 °C until it sank, and coronal cerebellar cryotome section (30 µm thick) was processed for free-floating immunohistochemistry using a rabbit polyclonal antiserum against calbindin (1:4,000; Swant).

Immunofluorescence

Whole-mount *LAL*, *MG*, and *TVA* (*Transversus Abdominis*) muscles were incubated for 30 min in 4 % paraformaldehyde and immunostained as described previously [30]. Briefly, the muscles were bathed in 0.1 M glycine in PBS for 30 min, permeabilized with 1 % (v/v) Triton X-100 in PBS for 1 h, and then incubated in 5 % (w/v) BSA, 1 % Triton X-100 in PBS for 1 h. The tissue was then incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies of interest (see below) and the following day, the muscles were rinsed for 1 h in PBS containing 0.05 % Triton X-100. After incubating for 1 h with the corresponding secondary antibodies (1:500; Alexa antibodies, Invitrogen) and 10 ng/ml rhodamine-BTX (Sigma Aldrich), and rinsing again with PBS containing 0.05 % Triton X-100 for 90 min, the muscles were mounted in Glycerol 50 % for visualization. Presynaptic terminals were labeled with antibodies against synaptophysin (1:500) and neurofilaments (NF; 1:500) (Santa Cruz).

Image acquisition and analysis

Fixed muscles were examined on an upright Leica DM 2500 confocal laser scanning microscope. During image acquisition, an alternating sequence of laser pulses was used to activate the different fluorescent probes. Images were taken using a 63× oil-immersion objective with a

numerical aperture of 1.3. Images from wild-type and mutant littermates were obtained under similar conditions (laser intensities and photomultiplier voltages), and usually on the same day. Morphometric analysis of the fluorescently labeled structures was performed offline with Fiji ImageJ (W. Rasband, National Institutes of Health). Endplate and synaptic vesicle (SV) areas were determined automatically by defining outline masks based on brightness thresholds from maximal projected confocal images [30].

Statistical analysis

The results were analyzed with the SPSS package for Windows and unless otherwise stated, the data represent the mean ± SEM values. The *tambaleante* and control samples were compared using the Student's *t* test (two tailed) and a *p* value <0.05 was considered statistically significant. *N* = number of mice, *n* = number of NMJ or number of fibers. All the data represent the analysis of at least three animals per genotype as previously performed [31].

Results

Age-dependent motor function impairment in *tambaleante* mutant mice

During the first month of life, the body weight of *tbl* mutant mice was the same as their wild-type littermates but from this age onwards (postnatal day 30, P30), the homozygous mutants were easily distinguished from their wild-type and heterozygous littermates through their lower body weight (Fig. 1a). In addition, the motor performance of the mutant mice was also altered from 5 weeks of age onwards, as measured during rotarod assays (Fig. 1b). This test requires both strength and motor coordination, so we also measured the animal's forelimb strength using a grip strength test. The *tbl* mutant mice older than P30 had less strength in their forelimbs than age-matched control mice (Fig. 1c). The ataxia phenotype was first evident in the *tbl* mice at around 2 months of age, together with PC loss [15], although no morphological differences were evident in PCs between P30 *tbl* and control littermates (Fig. 1d). Thus, our results suggest that *tbl* mice present a motor deficit prior to PC loss.

High frequency-induced neuromuscular depression is increased in *tambaleante* mutant mice at P30 and P120

The electrical neuromuscular properties of the *tbl* mice were studied in vivo by performing electromyography

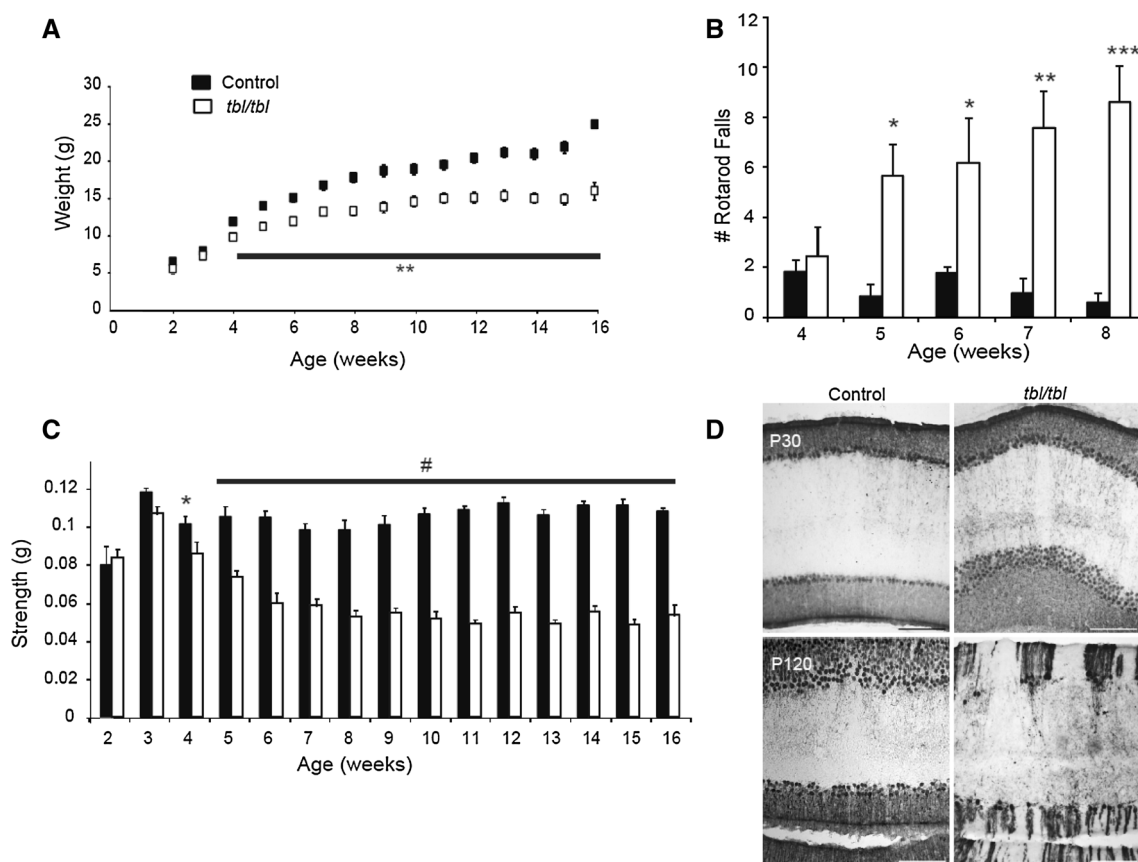


Fig. 1 Impaired motor strength and coordination in the *tambaleante* (*tbl*) mutant mice. **a** Body weight in mutant and control mice measured during the first 16 weeks of life ($N = 12$ mice per study group). **b** The number of falls from the rotarod increases in *tambaleante* mice from the fifth week of age ($N = 7$ mice in control

group and $N = 9$ in *tambaleante*). **c** Forelimb strength was measured with a grip strength meter ($N = 12$ mice per study group). **d** Coronal sections staining with Anti-Calbindin in a control and *tambaleante* mouse cerebellum aged 1 and 4 months old: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; # $p < 0.00005$

(EMG) on the *medial gastrocnemius* (*MG*) muscle at P15 (Fig. 2a), P30 (Fig. 2b) and P120 (Fig. 2c), using short-train stimuli at different frequencies. At P30, the depression at the end of a train of 30 stimuli at 100 Hz was higher in *tbl* mutant than in the wild-type mice when measured by normalization of the CMAP amplitude (Control: $10.26 \pm 3.9\%$, $N = 8$ and *tbl*: $30.78 \pm 6.8\%$, $N = 4$, $p < 0.037$), evidence of reduced neuromuscular function in the *tbl* mutant mice at this age. No such defect was found at lower stimulation frequencies (10 and 50 Hz, Fig. 2b, right panel). Impaired motor function persisted at four months of age in mutant mice, but surprisingly these differences were no bigger than in the one-month-old *tbl* mice (the depression at the end of the train in 4-month-old *tbl* mutant mice was $35.64 \pm 2.5\%$, $N = 11$: $p = 0.27$ in comparison with depression at the end of the train in P30 *tbl* mice). However, there were significant differences between *tbl* mice and their control 4-month-old littermates not only at 100 Hz (control: $27.79 \pm 2.8\%$, $N = 9$: $p < 0.024$) but also at 50 Hz stimulation (*tbl*: $15.07 \pm 1.8\%$, $N = 11$ and Control: $7.15 \pm 3.1\%$, $N = 9$, Fig. 2c: $p < 0.037$). At

P15, we found no differences in motor function in the EMG recordings (Fig. 2a), suggesting that impaired muscle neurotransmission was correlated with deficient grip strength and motor coordination. Together, these data show that impaired motor function is evident in *tbl* mutant mice from 30 days of age and that it persists over time.

Morphological alterations to the medial gastrocnemius neuromuscular junction in *tambaleante* mutant mice

We looked for possible morphological changes to the *MG* muscle at P30 in *tbl* mice to verify whether the altered EMG observed was accompanied by changes at the NMJ. When the size of the postsynaptic area was estimated by labeling nicotinic receptors with α -bungarotoxin-rhodamine, it was smaller in the mutants than in the controls at all ages studied (~ 32 , ~ 24 and 18% smaller at P15 ($p = 0.0000007$), P30 ($p < 0.000007$) and P120 ($p < 0.01$), respectively: Fig. 3a, b). Thus, the alterations to the EMG observed were accompanied by morphological changes at the synapse. Interestingly, the decrease in NMJ

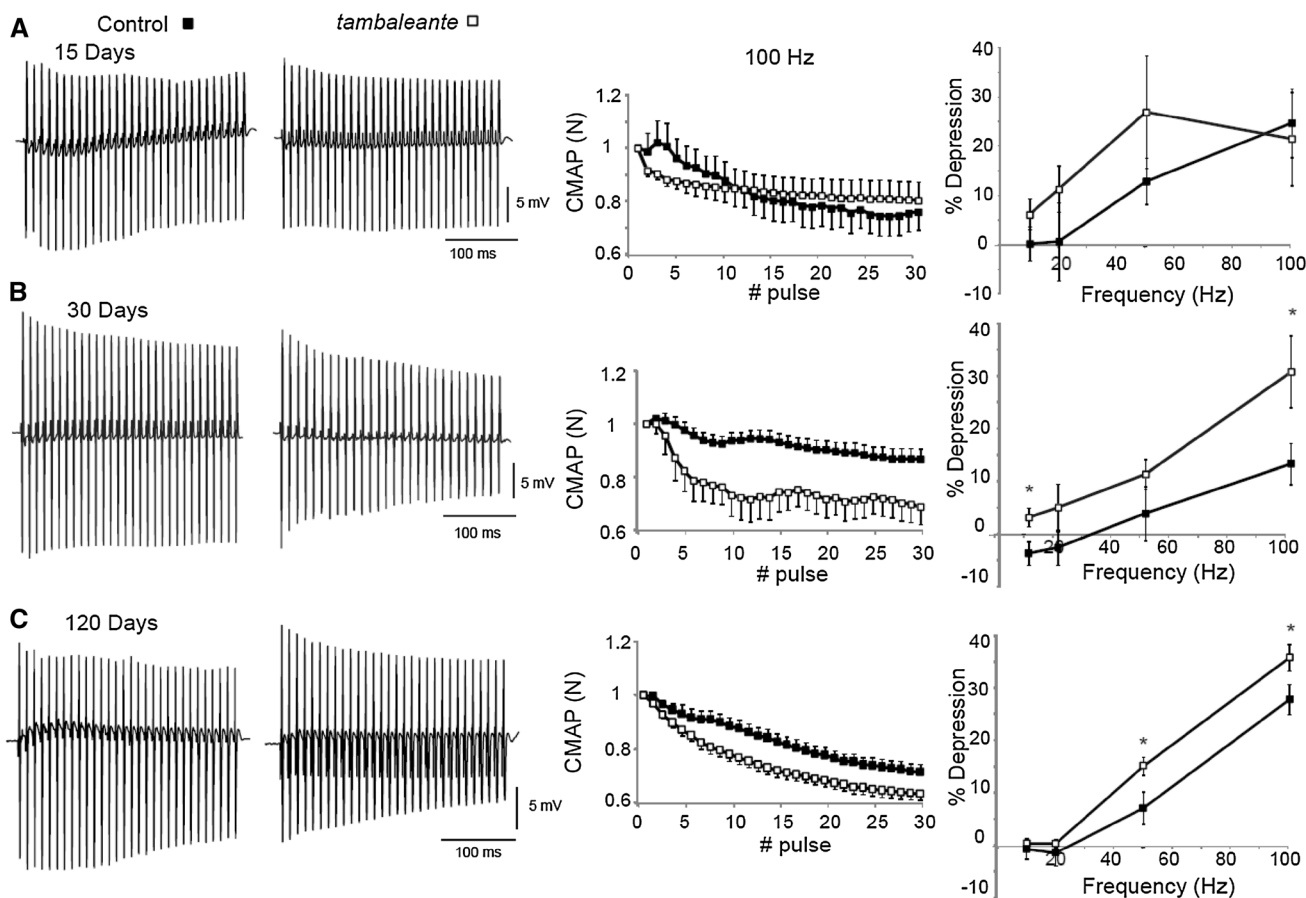


Fig. 2 EMG measurements of CMAP amplitudes in the *MG* of control and *tambaleante* mice reveal reduced neurotransmission efficacy in the *tbl* mice at postnatal day 30 and 120. Representative recordings during a train of stimuli at 100 Hz in a control and *tbl* mouse on postnatal days 15 ($N = 5$ mice per study group), 30 ($N = 8$ mice in control group and $N = 4$ in *tbl*) and 120 ($N = 9$ mice in

control group and $N = 11$ in *tbl*). Depression of CMAP amplitudes (normalized to the first response) during a train of stimuli of 300 ms at 100 Hz in control and mutant mice at all the ages studied. **a–c** Relative depression of the CMAP amplitudes at the quasi steady-state level for stimulation frequencies from 10 to 100 Hz: $*p < 0.05$

postsynaptic area appeared since P15, before the onset of the functional impairment characterized by EMG, indicative of altered NMJ development.

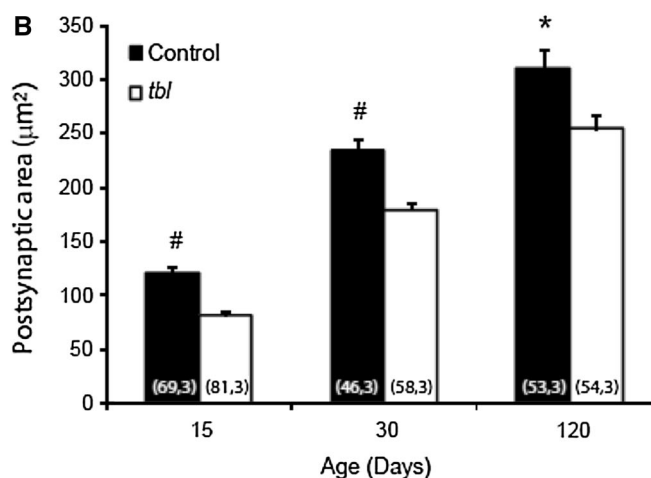
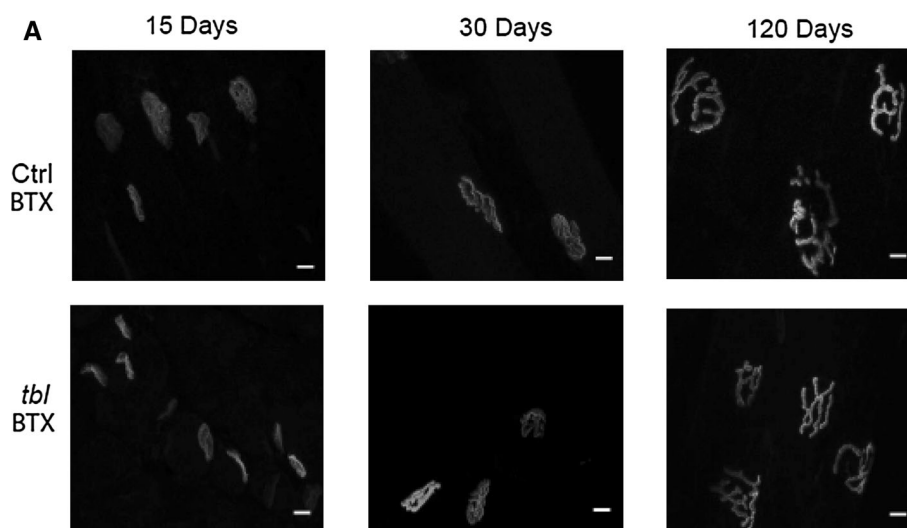
The neuromuscular junction of fast- and slow-twitch muscle fibers is morphological altered in *tambaleante* mutant mice

The *MG* is a mixed muscle with about 50 % slow-twitch type muscle fibers and 50 % fast-twitch fibers. Thus, we assessed whether the alterations to the NMJ were restricted to a particular muscle fiber type in *tbl* mice. As models of fast- and slow-twitch muscles, the *levator auris longus* (*LAL*) and *Transversus Abdominis* (*TVA*) muscle were immunostained with an antibody against neurofilaments and synaptophysin to label the presynaptic compartment, and with α -bungarotoxin-rhodamine to label postsynapses in P15 control and *tbl* littermates. In the *tbl LAL* muscle, there was a ~ 23 and 29 % decrease in

labeling in the vesicular and postsynaptic areas, respectively, with respect to the control mice (Fig. 4a–c). Similar results were observed in the *TVA* muscle, with a significant decrease in the vesicular and postsynaptic areas of the *tbl* mice ~ 11 and ~ 29 percent lower than in control mice (Fig. 4d–f), suggesting that both types of muscle fibers are affected similarly in the *tbl* mice. These vesicular and postsynaptic differences persisted, as witnessed when a similar morphological study was performed on the *LAL* muscle from animals aged from P15 to four months of age (Supplementary Figure 1). Interestingly, the size of the estimated areas increased over time in both control and *tbl* mice but nevertheless, the significant difference in the vesicle and postsynaptic area was maintained. For example, from P15 to P120 the increment in vesicular area was ~ 136 % in mutants and ~ 119 % in controls, furthermore during the same period the postsynaptic area increased ~ 136 and ~ 111 %, respectively.

Fig. 3 BTX area in *MG* motor terminals of *tbl* mice is smaller than in control littermates at P15, P30 and P120.

a Representative *en face* views of the neuromuscular junction (NMJ) from the *MG* muscle stained with BTX-Rho (*gray*) at P15, P30 and P120. Images are Z-stack projections and the scale bar 20 μm . **b** The mean postsynaptic areas at all ages studied: * $p < 0.05$; # $p < 0.00005$ [(*n*, *N*), *n* number of NMJ, *N* number of mice]



Impairment in evoke neurotransmitter release in neuromuscular junction of *tambaleante* mutant mice

To study the effect of the *HERC1* mutation on neurotransmitter release, we obtained intracellular recordings from the *LAL* muscle of two-month-old mice. We first recorded impaled muscle fibers to measure the amplitude of mEPPs from control and *tambaleante* mutant mice. The rank sum test indicated that the median mEPP amplitude in mutant fibers (1.51 mV) was not statistically different from that of the controls (1.94 mV, $p = 0.294$; Fig. 5a). We then examined evoked neurotransmitter release at motor terminals of the *LAL* muscle in response to a single action potential. The mean size of the EPPs in control animals was larger than in their *tbl* littermates (mutants: 27.60 ± 2.49 mV; controls: 41.98 ± 4.81 mV, $p < 0.01$; Fig. 5b) and so, we also compared the QC defined as the number of vesicles that fuse per action potential. The QC was lower in mutants than in control littermates (compare

16.59 ± 1 and 23.34 ± 2.27 for *tbl* and control mice respectively, $p < 0.008$; Fig. 5c). Together, these data indicate that the morphological alterations found may be associated with functional impairment.

Short-term plasticity is preserved in the neuromuscular junction of *tambaleante* mutant mice

One possible explanation for the decline in evoked neurotransmitter release could be the inability to maintain vesicle release during a train of stimuli [32]. To examine this possibility, we compared the EPP amplitudes in control and mutant fibers during a train of 10 stimuli at different stimulation frequencies (10, 20, 50 and 100 Hz), normalizing the EPP amplitudes recorded to the first response (Fig. 6a). No differences in short-term plasticity were found between controls and *tbl* mice at any stimulation frequency (Fig. 6b). We also measured the pair-pulse ratio as an indicator of the initial vesicular release probability.

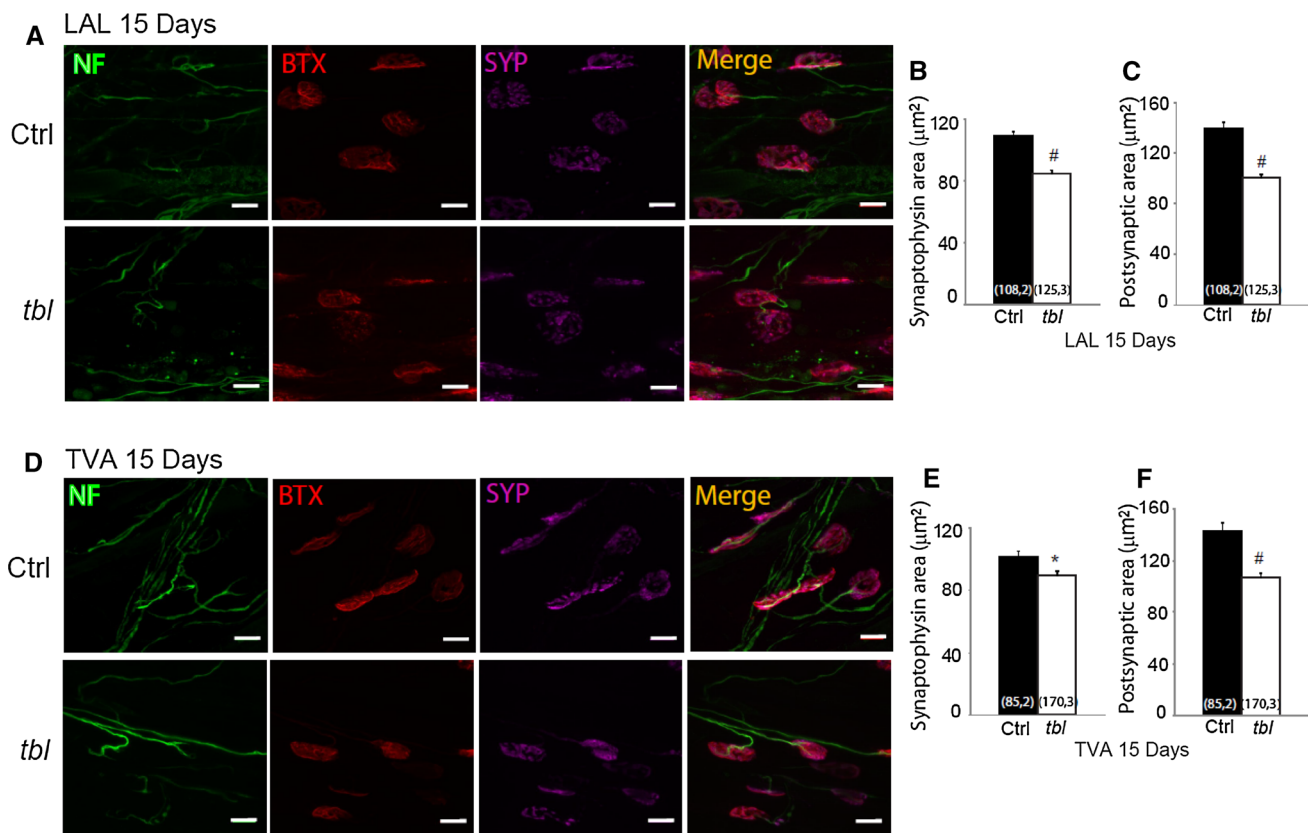


Fig. 4 SYP and BTX areas in motor terminals of *tbl* mice are smaller than in control littermates at P15 in fast- and slow-twitch muscle. Representative *en face* views of NMJs from the LAL (a) and TVA (d) muscle stained with BTX-Rho (red), anti-SYP (magenta) and NF (green). Images are Z-stack projections and the scale bar 10 µm. The mean synaptophysin areas were significantly smaller in mutants than

in control terminals in both muscles: LAL (b) and TVA (e). The mean postsynaptic areas were significantly smaller in mutants than in control terminals, in both the LAL (c) and TVA (f) muscles: * $p < 0.05$; # $p < 0.00005$ [(*n*, *N*), *n* number of NMJ, *N* number of mice]

No differences between controls and mutants were found at different frequencies (10–100 Hz: Fig. 6c) and thus short-term plasticity was well preserved in *tbl* mutant terminals despite the decrease in EPP amplitude and QC.

The readily releasable pool (RRP) is diminished in *tambaleante* mutant mice

The altered vesicular area and evoked release in *tbl* mutant mice might be due to a reduction in the number of vesicles available for release. We estimated the size of the RRP in *tbl* mutant mice through a functional assay of the representative EPP recording at 100 Hz during a 1 s stimulation (Fig. 7a). The mean RRP size was significantly smaller (by 35 %) in *tbl* mice (*tbl*: 900.7 ± 62.5 ; $n = 33$ terminals, 4 mice; Control: 1370.8 ± 106.5 ; $n = 23$ terminals, 3 mice, $p = 0.0003$: Fig. 7b), a decrease that may reflect a fall in the number of vesicles available (*n*) to be released or in the probability of release (*Pr*). Therefore, we estimated these parameters (see “Materials and methods”) and while the vesicle release probability was not significantly different

between control and *tbl* mice (*tbl*: 0.57 ± 0.03 ; Control: 0.55 ± 0.03 , $p = 0.53$: Fig. 7c), the number of available vesicles was significantly lower in mutant terminals (*tbl*: 28.51 ± 2.49 ; Control: 41.37 ± 3.74 , $p = 0.006$: Fig. 7c). Hence, the lower QC appeared to be due to a reduction in the RRP size.

Discussion

We show here that HERC1 E3 Ubiquitin Ligase fulfills an important role in maintaining normal evoked neurotransmitter release at the mouse NMJ. The alteration in HERC1 function present in *tambaleante* mice provokes a reduction in the number of vesicles available at these synapses. Furthermore, the motor dysfunction in these mice precedes the onset of the ataxic phenotype.

Our EMG measurements allow us to measure motor function in the mouse hind limb muscle (*MG*) in vivo and compare it with control littermates. Our results suggest that the mutation in the HERC1 E3 Ubiquitin Ligase (Gly483Glu

Fig. 5 Impaired evoked neurotransmitter release in *tbl* mutant mice. **a** Representative traces and median and interquartile range of mEPPs in control and mutant terminals. Representative EPP traces and mean EPP amplitudes (**b**) and mean quantum content (QC) (**c**) in control and *tbl* terminals: * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ [n, N], n number of fibers, N number of mice]

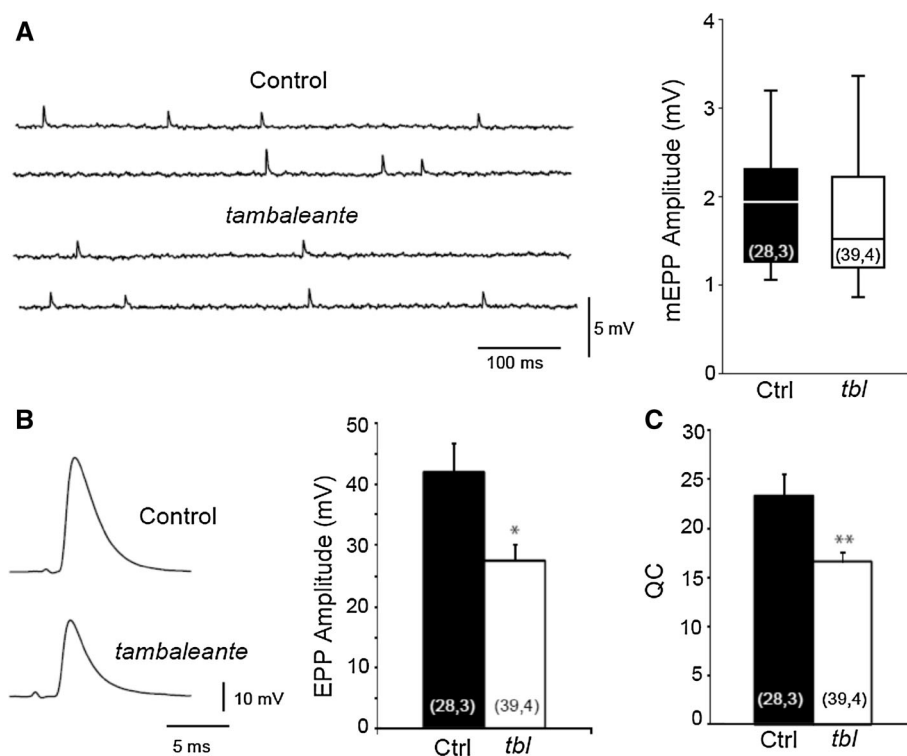


Fig. 6 Short-term plasticity is preserved in neuromuscular junctions in *tambaleante* mutant mice. **a** Representative traces in response to a train of stimuli at 100 Hz and EPP amplitude normalized to the first response. Train index at the end of the responses (**b**) and pair pulse facilitation (PPF) at all the frequencies of stimulation studied [n, N], n number of fibers, N number of mice]

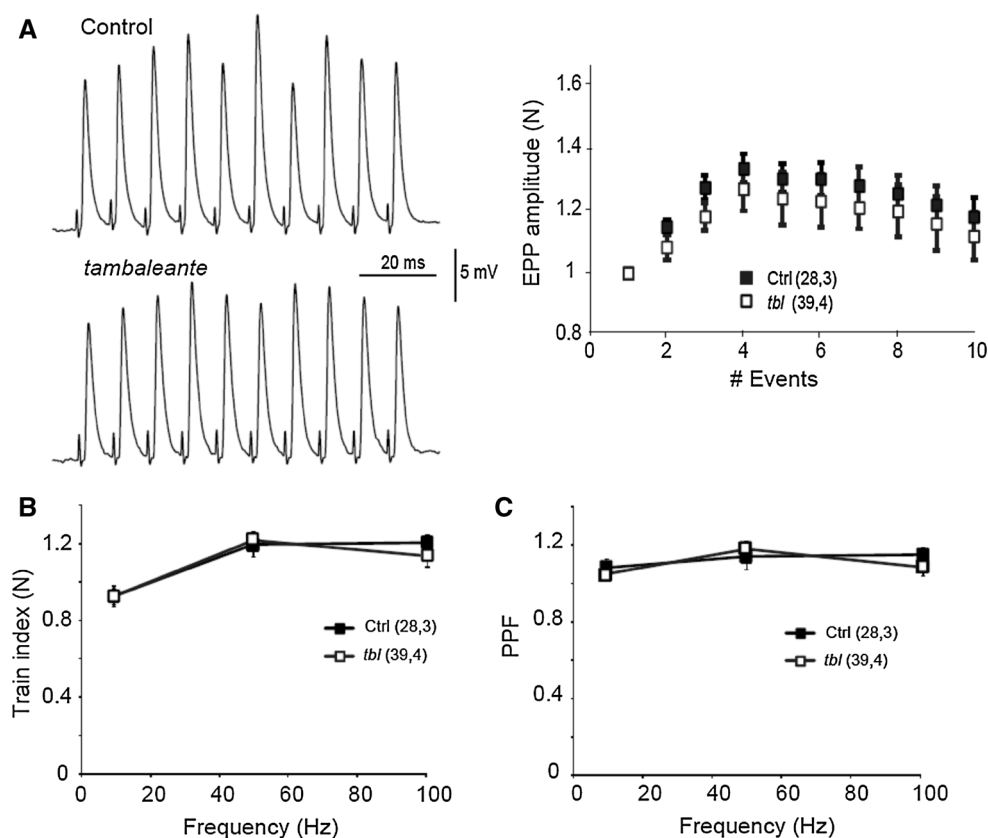
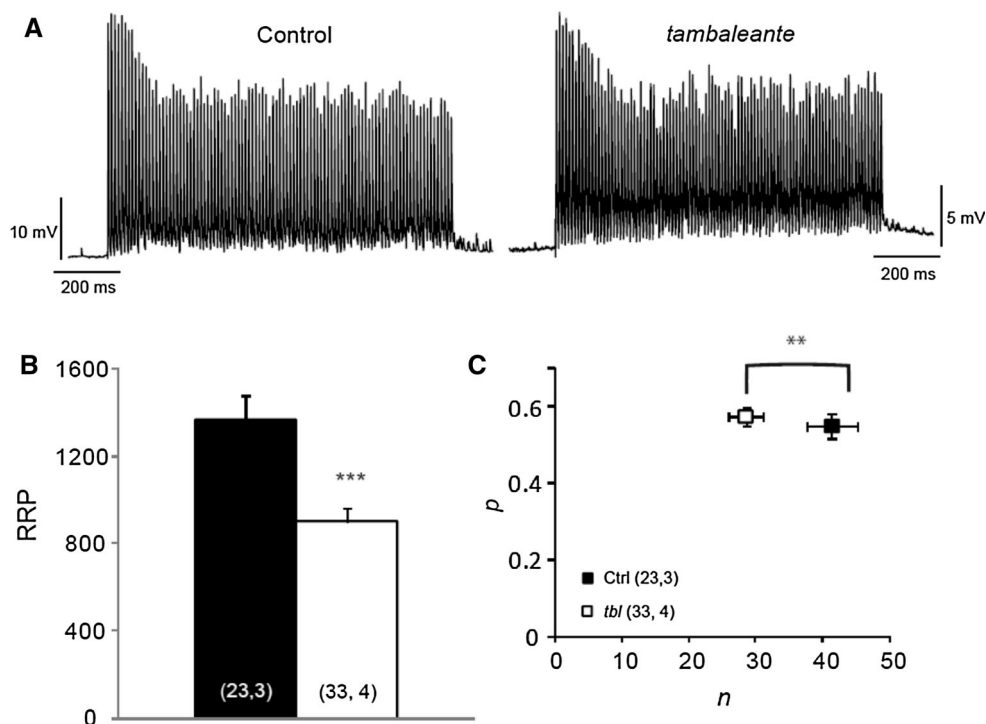


Fig. 7 The readily releasable pool (RRP) is decreased in *tambaleante* mutant mice. **a** Representative traces during a 100 Hz stimulation train of 1 s in a control and *tbl* mouse. **b** The mean RRP estimated in both groups. **c** n (number of occupied sites) and p (probability of release) estimated in control and *tbl* mice: ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$ [(n, N) , n number of fibers, N number of mice]



substitution) present in the *tbl* mice is responsible for the altered motor phenotype we found at P30, although interestingly this altered motor effect is evident before the onset of the ataxic phenotype. This phenomenon is not exclusive to *tbl* as there are other mouse models that exhibit motor impairment prior to the loss of PCs and the appearance of ataxia, such as: the *staggerer* mutant mice (functional loss of retinoid-related orphan receptor α —ROR α -transcription factor); *rolling Nagoya* mice (mutation in the alpha1 subunit of the Cav2.1 channel); or the SCA1 conditional transgenic mice (a point mutation in ataxi-1) [33–36].

We detect motor dysfunction in these mutant mice at 1 month of age, while NMJ abnormalities in slow- and fast-twitch muscles were even evident at 2 weeks of age, such as smaller synaptic vesicles and postsynaptic area. The difference in the area measured between the mutant and wild-type mice could be due to a generalized problem during development, although at 15 days of age there was no significant difference in body weight between the two groups of mice. Defects in NMJ maturation precede age-dependent motor dysfunction, as also observed in other mouse models where morphological problems associated with motor dysfunction appear prior to functional changes [30, 37]. Furthermore, other mice carrying mutations in proteins implicated in the ubiquitin–proteasome system also display motor impairment [5–8, 13]. Indeed, motor impairment and morphological changes at NMJs were also accompanied by deficits in neurotransmission. This is not surprising because there are many examples of mouse disease models with

motor disorders associated with impaired neuromuscular transmission, such as spinal muscular atrophy, lateral amyotrophic sclerosis, and Huntington’s disease [20, 24, 38–40]. Thus, these data support a model in which HERC1 plays a key role in the development and maintenance of mature NMJs.

The UPS is required for the rapid and precise control of the amount of proteins in neurons, some of which are essential for synaptic processes (reviewed by [1, 41, 42]). When a presynaptic terminal is activated, its complex molecular machinery drives the exocytosis of SVs, continuing the cycle with their endocytosis, recycling and refilling with neurotransmitters for a new round of release [43]. This process is tightly regulated by the activation and degradation of the proteins implicated, among other events [4, 41, 42]. In a *Drosophila* model, it was previously shown that proteasome inhibitors increase NMJ evoked release [44] and furthermore, proteasome inhibitors (clasto-lactacystin-lactone, epoxomicin or MG-132) augment the recycling pool in primary cultures of mouse hippocampal neurons, without affecting the probability of vesicle release [45]. Similarly, the probability of neurotransmitter release was not affected in NMJs from *tambaleante* mice, although we observed a decrease in EPP amplitude associated with a decrease in the RRP and number of vesicles available. Therefore, it is likely that the HERC1 Gly483Glu substitution in *tbl* mice has the opposite effect to that produced by proteasome inhibitors. In fact, the expression of the mutated HERC1 protein is greater in *tbl* mice than in

controls [15], suggesting that the increase in proteasomal activity could be sustained in *tbl* mice. Indeed, in mice carrying a loss-of-function USP14 (another UPS component, a deubiquitinase) there are fewer ubiquitinated proteins as well as less evoked release at the NMJ, supporting our hypothesis [13, 46, 47].

The mechanism by which HERC1 regulates neurotransmission remains unknown, although animal models with alterations in some UPS components present changes in the expression of proteins involved in the SV cycle, such as synaptophysin [48], SNAP25 [49], syntaxin [50], and MUNC13 [4]. Furthermore, recent studies have found that USP14 might have a different function to that of proteasomal catalytic activity [51, 52]. The same could occur with the E3-ligase-ubiquitin HERC1 and further studies will be necessary to determine the mechanism driving altered vesicle homeostasis in the *tambaleante* mutants, and how this alteration could participate in neurodegeneration.

In conclusion, our results show that HERC1 is essential for neurotransmitter release and vesicle homeostasis in NMJs. Although the exact mechanism involved in NMJ development and functional impairment is not known, our results invite us to hypothesize that the mutation of this UPS component could be implicated in motor neuron disease. Understanding the specific proteins involved in synaptic regulation will open new avenues for the treatment of these neurodegenerative diseases.

Acknowledgments We are grateful to Drs. Manel Santafe and Luis Miguel Real for their helpful comments and Dr. M. Sefton for editorial assistance. This work was supported by grants from MINECO JCI-2011-08888 (RR) and BFU2011-27207, and by the Fundación Ramón Areces (AMC).

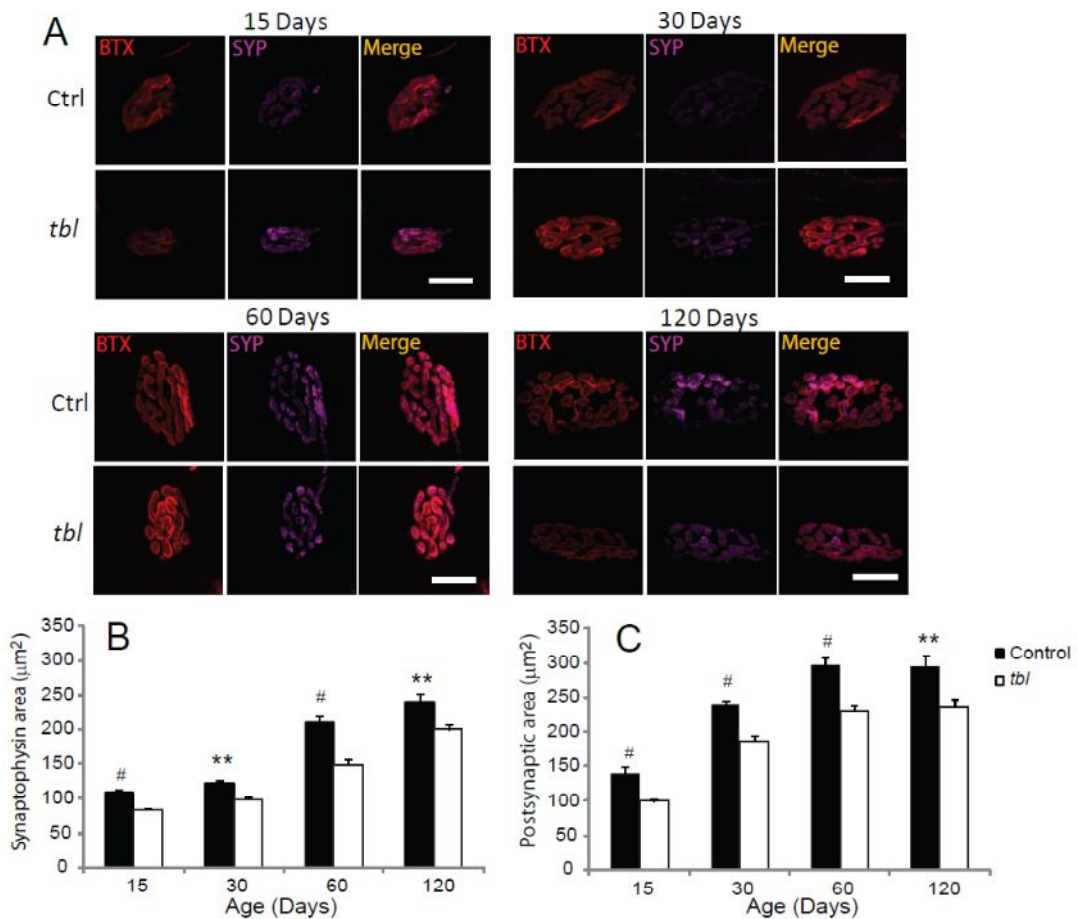
References

- Hegde AN, Upadhy SC (2007) The ubiquitin-proteasome pathway in health and disease of the nervous system. *Trends Neurosci* 30(11):587–595
- van Tijn P, Hol EM, van Leeuwen FW, Fischer DF (2008) The neuronal ubiquitin-proteasome system: murine models and their neurological phenotype. *Prog Neurobiol* 85(2):176–193
- Lu Z, Je HS, Young P, Gross J, Lu B, Feng G (2007) Regulation of synaptic growth and maturation by a synapse-associated E3 ubiquitin ligase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 177(6):1077–1089
- Tada H, Okano HJ, Takagi H, Shibata S, Yao I, Matsumoto M, Saiga T, Nakayama KI, Kashima H, Takahashi T, Setou M, Okano H (2010) Fbxo45, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity. *J Biol Chem* 285(6):3840–3849
- Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H, Jiang H, Hirano M, Rampersaud E, Jansen GH, Donkervoort S, Bigio EH, Brooks BR, Ajroud K, Sufit RL, Haines JL, Mugnaini E, Pericak-Vance MA, Siddique T (2011) Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477(7363):211–215
- Dlamini N, Josifova DJ, Paine SM, Wraige E, Pitt M, Murphy AJ, King A, Buk S, Smith F, Abbs S, Sewry C, Jacques TS, Jungbluth H (2013) Clinical and neuropathological features of X-linked spinal muscular atrophy (SMA2) associated with a novel mutation in the UBA1 gene. *Neuromuscul Disord* 23(5):391–398
- Ramser J, Ahearn ME, Lenski C, Yariz KO, Hellebrand H, von Rhein M, Clark RD, Schmutzler RK, Lichtner P, Hoffman EP, Meindl A, Baumbach-Reardon L (2008) Rare missense and synonymous variants in UBE1 are associated with X-linked infantile spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 82(1):188–193
- Rusmini P, Sau D, Crippa V, Palazzolo I, Simonini F, Onesto E, Martini L, Poletti A (2007) Aggregation and proteasome: the case of elongated polyglutamine aggregation in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurobiol Aging* 28(7):1099–1111
- de Vrij FM, Fischer DF, van Leeuwen FW, Hol EM (2004) Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Prog Neurobiol* 74(5):249–270
- Rubinsztein DC (2006) The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443(7113):780–786
- Upadhy SC, Hegde AN (2005) Ubiquitin-proteasome pathway components as therapeutic targets for CNS maladies. *Curr Pharm Des* 11(29):3807–3828
- van Tijn P, Dennissen FJ, Gentier RJ, Hobo B, Hermes D, Steinbusch HW, Van Leeuwen FW, Fischer DF (2012) Mutant ubiquitin decreases amyloid beta plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 61(5):739–748
- Chen PC, Qin LN, Li XM, Walters BJ, Wilson JA, Mei L, Wilson SM (2009) The proteasome-associated deubiquitinating enzyme Usp14 is essential for the maintenance of synaptic ubiquitin levels and the development of neuromuscular junctions. *J Neurosci* 29(35):10909–10919
- Kowalski JR, Dube H, Touroutine D, Rush KM, Goodwin PR, Carozza M, Didier Z, Francis MM, Juo P (2013) The Anaphase-Promoting Complex (APC) ubiquitin ligase regulates GABA transmission at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Mol Cell Neurosci* 58C:62–75
- Mashimo T, Hadjebi O, Amair-Pinedo F, Tsurumi T, Langa F, Serikawa T, Sotelo C, Guenet JL, Rosa JL (2009) Progressive Purkinje cell degeneration in *tambaleante* mutant mice is a consequence of a missense mutation in HERC1 E3 ubiquitin ligase. *PLoS Genet* 5(12):e1000784
- Porrás-García ME, Ruiz R, Pérez-Villegas EM, Armengol JA (2013) Motor learning of mice lacking cerebellar Purkinje cells. *Front Neuroanat* 7:4
- Rossi F, Jankovski A, Sotelo C (1995) Target neuron controls the integrity of afferent axon phenotype: a study on the Purkinje cell-climbing fiber system in cerebellar mutant mice. *J Neurosci* 15(3 Pt 1):2040–2056
- Wassef M, Sotelo C, Cholley B, Brehier A, Thomasset M (1987) Cerebellar mutations affecting the postnatal survival of Purkinje cells in the mouse disclose a longitudinal pattern of differentially sensitive cells. *Dev Biol* 124(2):379–389
- Ruiz R, Lin J, Forgie A, Foletti D, Shelton D, Rosenthal A, Tabares L (2005) Treatment with trkC agonist antibodies delays disease progression in neuromuscular degeneration (nmd) mice. *Hum Mol Genet* 14(13):1825–1837
- Ruiz R, Tabares L (2014) Neurotransmitter release in motor nerve terminals of a mouse model of mild spinal muscular atrophy. *J Anat* 224(1):74–84
- Simon CM, Jablonka S, Ruiz R, Tabares L, Sendtner M (2010) Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves motor

- function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 19(6):973–986
22. Ruiz R, Biea IA, Tabares L (2014) alpha-Synuclein A30P decreases neurodegeneration and increases synaptic vesicle release probability in CSPalpha-null mice. *Neuropharmacology* 76 Pt A:106–117
 23. Ruiz R, Casanas JJ, Sudhof TC, Tabares L (2008) Cysteine string protein-alpha is essential for the high calcium sensitivity of exocytosis in a vertebrate synapse. *Eur J Neurosci* 27(12):3118–3131
 24. Ruiz R, Casanas JJ, Torres-Benito L, Cano R, Tabares L (2010) Altered intracellular Ca²⁺ homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 30(3):849–857
 25. McLachlan EM, Martin AR (1981) Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J Physiol* 311:307–324
 26. Ruiz R, Cano R, Casanas JJ, Gaffield MA, Betz WJ, Tabares L (2011) Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. *J Neurosci* 31(6):2000–2008
 27. Elmqvist D, Quastel DM (1965) A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. *J Physiol* 178(3):505–529
 28. Yang L, Wang B, Long C, Wu G, Zheng H (2007) Increased asynchronous release and aberrant calcium channel activation in amyloid precursor protein deficient neuromuscular synapses. *Neuroscience* 149(4):768–778
 29. Fontan-Lozano A, Suarez-Pereira I, Gonzalez-Forero D, Carrion AM (2011) The A-current modulates learning via NMDA receptors containing the NR2B subunit. *PLoS One* 6(9):e24915
 30. Torres-Benito L, Neher MF, Cano R, Ruiz R, Tabares L (2011) SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals. *PLoS One* 6(10):e26164
 31. Arnold AS, Gill J, Christe M, Ruiz R, McGuirk S, St-Pierre J, Tabares L, Handschin C (2014) Morphological and functional remodelling of the neuromuscular junction by skeletal muscle PGC-1alpha. *Nat Commun* 5:3569
 32. Liu G, Tsien RW (1995) Properties of synaptic transmission at single hippocampal synaptic boutons. *Nature* 375(6530):404–408
 33. Caston J, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1995) Motor behavior of heterozygous staggerer mutant (+/sg) versus normal (+/+) mice during aging. *Behav Brain Res* 72(1–2):97–102
 34. Clark HB, Burright EN, Yunis WS, Larson S, Wilcox C, Hartman B, Matilla A, Zoghbi HY, Orr HT (1997) Purkinje cell expression of a mutant allele of SCA1 in transgenic mice leads to disparate effects on motor behaviors, followed by a progressive cerebellar dysfunction and histological alterations. *J Neurosci* 17(19):7385–7395
 35. Takahashi E, Niimi K, Itakura C (2010) Neonatal motor functions in Cacna1a-mutant rolling Nagoya mice. *Behav Brain Res* 207(2):273–279
 36. Takechi Y, Mieda T, Iizuka A, Toya S, Suto N, Takagishi K, Nakazato Y, Nakamura K, Hirai H (2013) Impairment of spinal motor neurons in spinocerebellar ataxia type 1-knock-in mice. *Neurosci Lett* 535:67–72
 37. Sleigh JN, Grice SJ, Burgess RW, Talbot K, Cader MZ (2014) Neuromuscular junction maturation defects precede impaired lower motor neuron connectivity in Charcot-Marie-Tooth type 2D mice. *Hum Mol Genet* 23(10):2639–2650
 38. Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marce M, Griffin JW, Rich MM, Sumner CJ (2009) Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 29(3):842–851
 39. Rocha MC, Pousinha PA, Correia AM, Sebastiao AM, Ribeiro JA (2013) Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset. *PLoS One* 8(9):e73846
 40. Rozas JL, Gomez-Sanchez L, Tomas-Zapico C, Lucas JJ, Fernandez-Chacon R (2011) Increased neurotransmitter release at the neuromuscular junction in a mouse model of polyglutamine disease. *J Neurosci* 31(3):1106–1113
 41. DiAntonio A, Hicke L (2004) Ubiquitin-dependent regulation of the synapse. *Annu Rev Neurosci* 27:223–246
 42. Kowalski JR, Juo P (2012) The role of deubiquitinating enzymes in synaptic function and nervous system diseases. *Neural Plast* 2012:892749
 43. Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509–547
 44. Speese SD, Trotta N, Rodesch CK, Aravamudan B, Broadie K (2003) The ubiquitin proteasome system acutely regulates presynaptic protein turnover and synaptic efficacy. *Curr Biol* 13(11):899–910
 45. Willeumier K, Pulst SM, Schweizer FE (2006) Proteasome inhibition triggers activity-dependent increase in the size of the recycling vesicle pool in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 26(44):11333–11341
 46. Bhattacharyya BJ, Wilson SM, Jung H, Miller RJ (2012) Altered neurotransmitter release machinery in mice deficient for the deubiquitinating enzyme Usp14. *Am J Physiol Cell Physiol* 302(4):C698–C708
 47. Chen PC, Bhattacharyya BJ, Hanna J, Minkel H, Wilson JA, Finley D, Miller RJ, Wilson SM (2011) Ubiquitin homeostasis is critical for synaptic development and function. *J Neurosci* 31(48):17505–17513
 48. Wheeler TC, Chin LS, Li Y, Roudabush FL, Li L (2002) Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of seven in absentia. *J Biol Chem* 277(12):10273–10282
 49. Ma Z, Portwood N, Foss A, Grill V, Bjorklund A (2005) Evidence that insulin secretion influences SNAP-25 through proteasomal activation. *Biochem Biophys Res Commun* 329(3):1118–1126
 50. Chin LS, Vavalle JP, Li L (2002) Staring, a novel E3 ubiquitin-protein ligase that targets syntaxin 1 for degradation. *J Biol Chem* 277(38):35071–35079
 51. Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315(5809):201–205
 52. Walters BJ, Hallengren JJ, Theile CS, Ploegh HL, Wilson SM, Dobrunz LE (2014) A catalytic independent function of the deubiquitinating enzyme USP14 regulates hippocampal synaptic short-term plasticity and vesicle number. *J Physiol* 592(Pt 4):571–586

Supplementary Figure 1: SYP and BTX areas in motor terminals of *tbl* mice are smaller than in the LAL muscle of control littermates at P15, P30, P60 and P120.

(A) Representative *en face* views of the neuromuscular junction from the LAL muscle stained with BTX-Rho (red) and anti-SYP (magenta) at P15, P30, P60 and P120. Images are Z-stack projections and the scale bar = 10 μm . (B & C) The mean synaptophysin (B) and BTX areas (C) were significantly smaller in mutants than in control terminals at all ages: ** $p < 0.005$; # $p < 0.00005$.





HERC 1 Ubiquitin Ligase Mutation Affects Neocortical, CA3 Hippocampal and Spinal Cord Projection Neurons: An Ultrastructural Study

Rocío Ruiz^{1,2}, Eva María Pérez-Villegas², Sara Bachiller², José Luis Rosa³ and José Angel Armengol^{2*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Seville, Seville, Spain, ² Department of Physiology, Anatomy and Cell Biology, University Pablo de Olavide, Seville, Spain, ³ Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Campus Bellvitge, University of Barcelona, Barcelona, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Luis Puelles,
Universidad de Murcia, Spain

Reviewed by:

Jean-Pierre Hornung,
University of Lausanne, Switzerland
Carlos Alfonso Bueno Lopez,
Universidad Miguel Hernández, Spain

*Correspondence:

José Angel Armengol
jaarmbut@upo.es

Received: 13 October 2015

Accepted: 04 April 2016

Published: 18 April 2016

Citation:

Ruiz R, Pérez-Villegas EM, Bachiller S, Rosa JL and Armengol JA (2016) HERC 1 Ubiquitin Ligase Mutation Affects Neocortical, CA3 Hippocampal and Spinal Cord Projection Neurons: An Ultrastructural Study. *Front. Neuroanat.* 10:42. doi: 10.3389/fnana.2016.00042

The spontaneous mutation *tambaleante* is caused by the Gly483Glu substitution in the highly conserved N terminal RCC1-like domain of the HERC1 protein, which leads to the increase of mutated protein levels responsible for cerebellar Purkinje cell death by autophagy. Until now, Purkinje cells have been the only central nervous neurons reported as being targeted by the mutation, and their degeneration elicits an ataxic syndrome in adult mutant mice. However, the ultrastructural analysis performed here demonstrates that signs of autophagy, such as autophagosomes, lysosomes, and altered mitochondria, are present in neocortical pyramidal, CA3 hippocampal pyramidal, and spinal cord motor neurons. The main difference is that the reduction in the number of neurons affected in the *tambaleante* mutation in the neocortex, the hippocampus, and the spinal cord is not so evident as the dramatic loss of cerebellar Purkinje cells. Interestingly, signs of autophagy are absent in both interneurons and neuroglia cells. Affected neurons have in common that they are projection neurons which receive strong and varied synaptic inputs, and possess the highest degree of neuronal activity. Therefore, because the integrity of the ubiquitin-proteasome system is essential for protein degradation and hence, for normal protein turnover, it could be hypothesized that the deleterious effects of the misrouting of these pathways would depend directly on the neuronal activity.

Keywords: autophagy, cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, neuron, proteasome, spinal cord, ubiquitin

INTRODUCTION

The mutation *tambaleante* (*tbl/tbl*) appeared spontaneously in the colony of the Pasteur Institute (Paris, France) at the end of the 1980s. Previous studies have correlated the motor phenotype of the mutation as characterized by tremor, unstable gait, and abnormal posture of the hind limbs, with an ataxic syndrome similar to others suffered by mutant mice that have lost cerebellar Purkinje cells (Wassef et al., 1987; Rossi et al., 1995). Purkinje cell loss takes place from the 2nd month of postnatal life on, the date from which ataxic signs become more and more evident

throughout the animal's lifespan, coinciding with the progressive death of the Purkinje cells, whose number decreases dramatically to almost disappearing in 1-year-old mice (Dusart et al., 2006). However, Purkinje cells seem not to be the exclusive target of the mutation; thus, we have recently reported that 1-month-old *tbl/tbl* mice—that is, before the beginning of Purkinje cell degeneration—present alterations of their motor performance. This motor impairment was closely related to three main alterations of the neuromuscular junction: (i) the reduction of the motor end-plate size; (ii) the decrease of neuromuscular activity efficiency *in vivo*; and (iii) the impairment of the evoked neurotransmitter release (Bachiller et al., 2015).

The *tbl/tbl* mutation was molecularly characterized as linked to the alteration of the HERC1 (HECT domain and RCC1 domain) E3 ubiquitin ligase protein, in which the Gly483Glu substitution induces the protein overexpression responsible for the *tbl/tbl* phenotype (Mashimo et al., 2009). HERC1 E3 ubiquitin ligase protein belongs to the ubiquitin–proteasome system (UPS; Hegde and Upadhyay, 2007; van Tijn et al., 2008). UPS plays a key role in the protein degradation pathway essential for neuronal homeostasis, and whose alteration has been postulated as involved in the pathogenesis of several neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's diseases (de Vrij et al., 2004; Upadhyay and Hegde, 2005; Rubinsztein, 2006; Hegde and Upadhyay, 2007; van Tijn et al., 2012), or the spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) X-spinal muscular atrophy (Rusmini et al., 2007; Ramser et al., 2008; Deng et al., 2011; Dlamini et al., 2013).

A high number of cerebellar mutant mice, irrespective of the molecular origin of their mutations, also possessed alterations in other regions of their central nervous systems (for a review, see Porrás-García et al., 2013). These data, together with the fact that neuromuscular transmission was also affected in the *tbl/tbl* mutation, led us to investigate the possibility that other regions of the *tbl/tbl* nervous system could also be damaged.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Tambaleante mice were obtained by breeding pairs of *tbl* carrier mice. Mice were genotyped by PCR as described previously (Mashimo et al., 2009), and 1- to 4-month-old *tbl/tbl* mice and isogenic wild type (*wt*) mice were used. Animal care was according to current Spanish legislation RD 53/2013 governing experimental animals (BOE 08/02/2013), and under the approval of the ethical committees of our universities.

Electron Microscopy Procedure

Mice were deeply anesthetized with an overdose of pentobarbital (80 mg/kg *i.p.*) and perfused intracardially with 1% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde in phosphate buffer 0.1 M (PB, pH 7.4). After dissection, the brain and spinal cord were fixed overnight in the same fixative at 4°C. Coronal slices of brain, cerebellum, and spinal cord were cut and postfixed in 2% OsO₄ in PB at room temperature.

Subsequently, the tissue was stained with 2.5% uranyl acetate in 70% ethanol at 4°C, dehydrated with ethanol and acetone at room temperature, and embedded in Durcupan (Fluka®). Semithin sections 1.5 μm thick were stained with 1% pyronin G and 1% toluidine blue. Ultrathin sections 60–70 nm thick were obtained from selected areas in a Leica UC6 ultramicrotome and collected on 200 mesh copper grids. To avoid the possibility of artifacts or precipitates, ultrathin sections were observed without uranyl acetate and lead citrate counterstaining on a Zeiss Libra 120 transmission electron microscope. Plates of figures were made using the software Photoshop 7.0 (Adobe®) without any additional correction of the microphotographs.

Immunohistochemical Procedure

Four-month-old *wt* and *tbl/tbl* mice were deeply anesthetized with an overdose of pentobarbital (80 mg/kg *i.p.*) and perfused intracardially with 4% paraformaldehyde in PB. After dissection, the brains were fixed overnight in the same fixative at 4°C, and immersed in 30% sucrose in PB at 4°C until they sank. Coronal 30 μm thick sections were cut with a freezing microtome and collected in PBS. The immunohistochemical procedure has been previously reported (Bachiller et al., 2015), with the difference that for permeabilization 0.1% saponin was used instead of 0.25% Triton X-100. The primary antibodies used for double labeling were: a rabbit polyclonal antibody against Calbindin D-28k (1:5000, Swant, Cb-38a), a mouse monoclonal antibody against NeuN (1:250, Millipore, mab377), a mouse monoclonal antibody against p62 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., SQSTM1 (D-3): sc-28359), a mouse monoclonal antibody against beclin-1 (1:100, abcam, ab62557), and a rabbit polyclonal antibody against light chain 3 (LC3; 1:100, Cell Signaling Technology #2275). The secondary antibodies used were: Alexa Fluor® 488 donkey-anti-rabbit (1:500, Invitrogen A21207) to detect calbindin, Alexa Fluor® 488 donkey-anti-mouse (1:500, Invitrogen A21202) to detect NeuN, Alexa Fluor® 594 donkey-anti-mouse (1:500, Invitrogen A21203) to detect p62 and beclin-1, and Alexa Fluor® 594 donkey-anti-rabbit (1:500, Invitrogen A21207) to detect LC3. Images were acquired in an upright Leica DM 2500 confocal laser scanning microscope. Plates of figures were made using the software Photoshop 7.0 (Adobe®) without any additional correction of the microphotographs.

Quantitative Analysis

The procedure followed to quantify beclin-1, LC3 and p62 immunoreactivity densities was previously reported (Bachiller et al., 2015). Briefly, during image acquisition, an alternating sequence of laser pulses was used to activate the different fluorescent probes. Images were taken using a 40× oil-immersion objective with a numerical aperture of 0.65. Images from *wt* and *tbl/tbl* hippocampus and cerebral cortex were obtained under similar conditions (laser intensities and photomultiplier voltages), and on the same session. Quantitative analysis of the fluorescent labeling density was performed offline with FijiImageJ (W. Rasband, National Institutes of Health). Size

of measured areas was determined automatically by defining outline masks based on brightness thresholds from maximal projected confocal images. The Student's *t* test (two tailed) was used to compare *tbl/tbl* and *wt* counts. A $p < 0.05$ value was considered as statistically significant.

RESULTS

The electron microscopic study of *tbl/tbl* brain showed a similar morphological characteristics for the vacuoles accumulated in the cytoplasm of the neurons of the different brain areas analyzed. Features demonstrative of all the phases of the autophagic process—from early double-bounded autophagic vacuoles (autophagosomes) to dark final autolysosome (Clarke, 1990; Dunn, 1990a,b)—are observed within the cytoplasm of the cell bodies of Purkinje cells (Figures 1C–F), spinal cord motor neurons (Figure 3), CA3 pyramidal neurons (Figures 4C–E), and neocortical pyramidal neurons (Figures 5E–H, 6A–D), and within their dendritic trees (Figures 3A, 6A,E). In semithin sections these vacuoles are observed as dense dark points (Figures 1A,B, 2C–E,I, 4B, 5B–D). Other cellular organelles are consistently found, for example multivesicular bodies (Figure 3C) and healthy mitochondria intermingled with mitochondria showing different stages of degeneration such as the blurring and loss of their crests, and the progressive darkening of the mitochondrial matrices (Figures 1, 3, 4, 5, 6).

The cerebellar cortex of *tbl/tbl*, in addition to Purkinje cell degeneration, shows an evident shallowing of the cytoplasm of glial processes surrounding Purkinje cell somata and dendrites (Figure 1). In the molecular layer, dark masses of debris resembling final autolysosomes are observed within the glial cytoplasm (Figures 1D,E). Rather than the product of a degenerative glial process, these cell inclusions are probably the morphological evidence of the homeostatic cleansing role played by glial cells in eliminating cellular debris resulting from the degeneration of the Purkinje cell dendrites.

The spinal cord—as was reported previously for the *tbl/tbl* cerebellum (Dusart et al., 2006), and now for the other brain areas analyzed here (data not shown)—exemplifies the progressive evolution of the formation of autolysosomes throughout the lifespan of the animals. Thus, in the youngest *tbl/tbl* mice very few motor neurons show scarce dark inclusions in their cytoplasm (Figure 2H). The number increased with age, with inclusions being observed in almost all the motor neurons in 4-month-old mice (Figure 2).

Alterations of the cell nucleus have been correlated with autophagy (Clarke, 1990; Dusart et al., 2006). Our study found—in addition to chromatin alterations in Purkinje cell nuclei (Dusart et al., 2006)—only two different nuclear alterations: (i) in the CA3 of the hippocampus, dark condensed nuclei throughout the pyramidal layer were occasionally observed (Figure 4B); and (ii) some pyramidal neocortical neurons, despite possessing an apparently normal chromatin, showed several isolated single-membrane empty vacuoles mainly located at the nuclear periphery (Figures 6A,D). However, no signs of a dramatic neuronal cell loss were observed in *tbl/tbl* spinal cord, CA3 area, or neocortex.

The neuropil of the anterior horn, CA3, and neocortex did not show obvious structural alterations, and the glial sheets surrounding neuronal bodies and prolongations—in contrast to the case of the cerebellar cortex (Figure 1)—had a normal appearance (Figures 3, 4, 5, 6). Similarly, axosomatic and axodendritic synapses established with the autophagosome/autolysosome-filled neurons observed here did not show degenerative changes (Figure 3).

The immunohistochemical study showed a prevalence of autophagy markers immunostaining in areas occupied by pyramidal cells as the pyramidal layer of the CA3 of the hippocampus and the layers II–III and V of the frontal neocortex (Figures 7, 8, 9), while layers I, IV and VI possessed a weak or occasionally inexistent labeling. The marker of the early stage of vesicle nucleation leading to the formation of autophagosomes beclin-1 (Kihara et al., 2001) was expressed in calbindin immunoreactive and calbindin non immunoreactive cell somata, and in all cases was more abundant in the cerebral cortex (Figures 7D–F) and the hippocampal CA3 region of *tbl/tbl* mice (Figures 7J–L) than in the same brain areas of *wt* mice (Figures 7A–C,G–I). The same immunohistochemical results were obtained by detecting the expression of the microtubule-associated protein—LC3, in which LC3 co-expressed with NeuN labeled somata more strongly in the cerebral cortex (Figures 8D–F) and hippocampal CA3 area (Figures 8J–L) of *tbl/tbl* mice than of *wt* mice (Figures 8A–C,G–I, respectively). Qualitatively, the most evident difference of the presence of autophagic vacuoles between *tbl/tbl* (Figures 9D–F) and *wt* (Figures 9A–C) mice was found in the detection of the expression of the LC3-phosphatidylethanolamine complex binder p62 (Franchi et al., 2012), which is co-expressed in calbindin immunoreactive neuronal cell bodies and dendrites. Therefore, present immunohistochemical analyses of the autophagic vacuole formation cycle demonstrated the presence of a fine grained labeling within the neuronal cytoplasm (Figures 7, 8, 9) congruent with electron microscopy findings, which in all cases was more evident in the *tbl/tbl* than in *wt* brains.

The density of the immunoreactivity for the three markers of the autophagic cycle studied here showed different results according to the analyzed area. Thus, in the CA3 of the hippocampus although the densities of beclin-1 and p62 immunoreactivity were higher in *tbl/tbl* mice than in *wt* ones, their values were under the level of significance (Figures 10A,C,E). On the contrary, *p* values showed statistic significances in the frontal cortex for the immunoreactivity densities of the three markers, which were higher in *tbl/tbl* than in *wt* mice (Figures 10B,D,F). Although most detailed analyses by using western blot of each specific brain area are needed, present data reinforces the qualitative differences of the autophagic cell cycle observed in the mutation *tambaleante*.

DISCUSSION

Autophagy is a cellular physiological mechanism that maintains cellular—and hence, neuronal—homeostasis by delivering

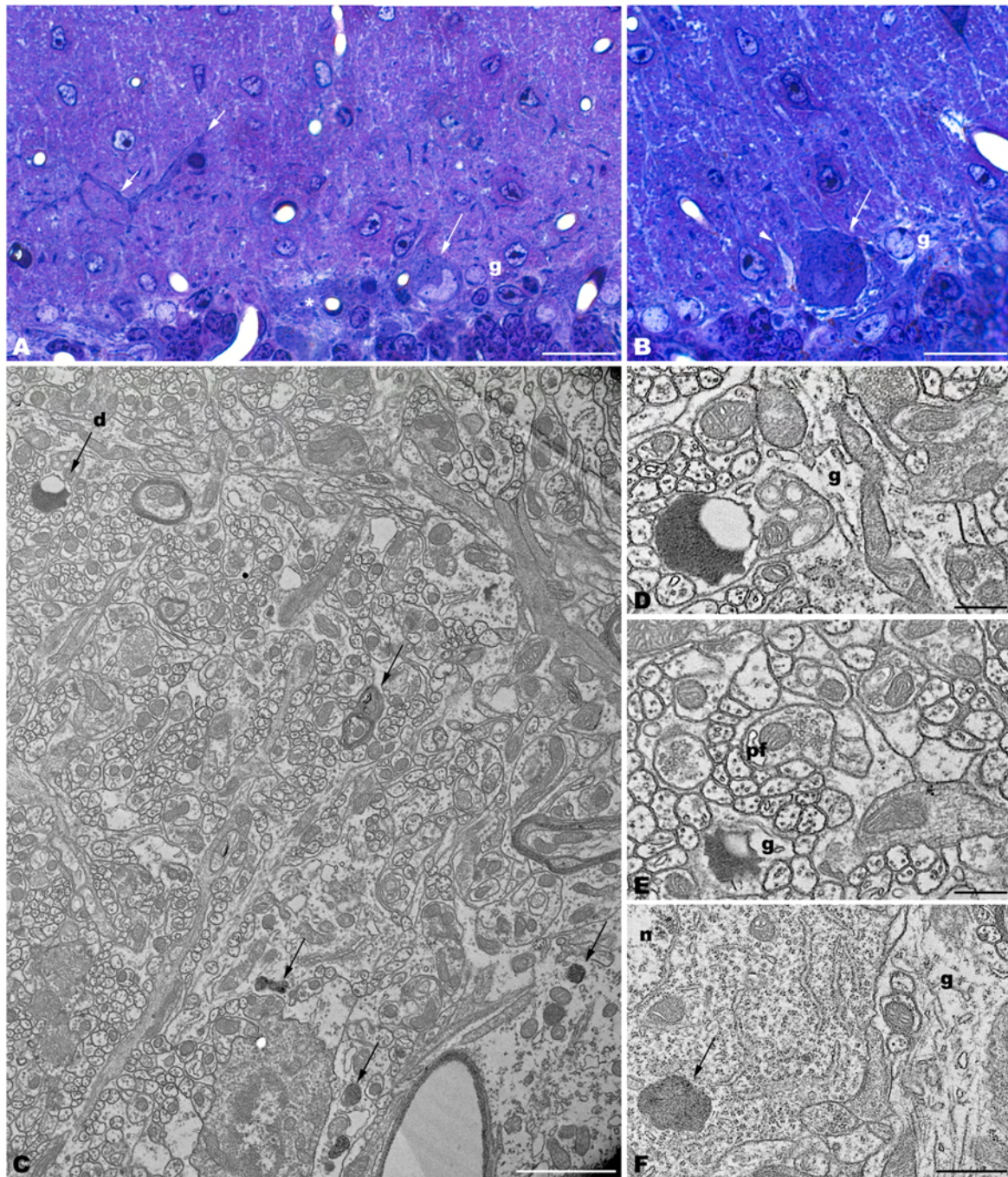


FIGURE 1 | Parasagittal sections through the cerebellar cortex of 4-month-old *tbl/tbl* mice. 1.5 μm -thick sections illustrate that disappeared Purkinje cells are substituted by glial Golgi-epithelial cells (g, **A,B**). Remaining degenerating Purkinje cells possess degenerative dark accumulations within the cytoplasm of the soma (**A,B**, asterisk, arrows) and thick, dark dendritic trees (**A**, small arrow). Note the swelling of glial processes surrounding Purkinje cells (**B**, arrowhead). Degenerative signs consisting of lysosomes, electron-dense debris, and autophagosomes with different degrees of evolution (arrows in **C-F**), are present in the dendrites of the molecular layer and in the Purkinje cells' cytoplasm (arrows, in **C,F**). Necrotic debris is also engulfed by glial cell processes (**D,E**, g). n, nucleus of a Purkinje cell. Pf, parallel fiber. Bars = 20 μm (**A,B**), 2 μm (**C**), and 0.5 μm (**D-F**).

damaged organelles and cytosolic metabolic products to the lysosomes for their degradation (for a review, see Lim and Yue, 2015; Nikolettou et al., 2015). During development,

autophagy plays a role in the programmed cell death process which refines the definitive number of neurons (Bredesen et al., 2006; Wu et al., 2015). In addition to its homeostatic role; a

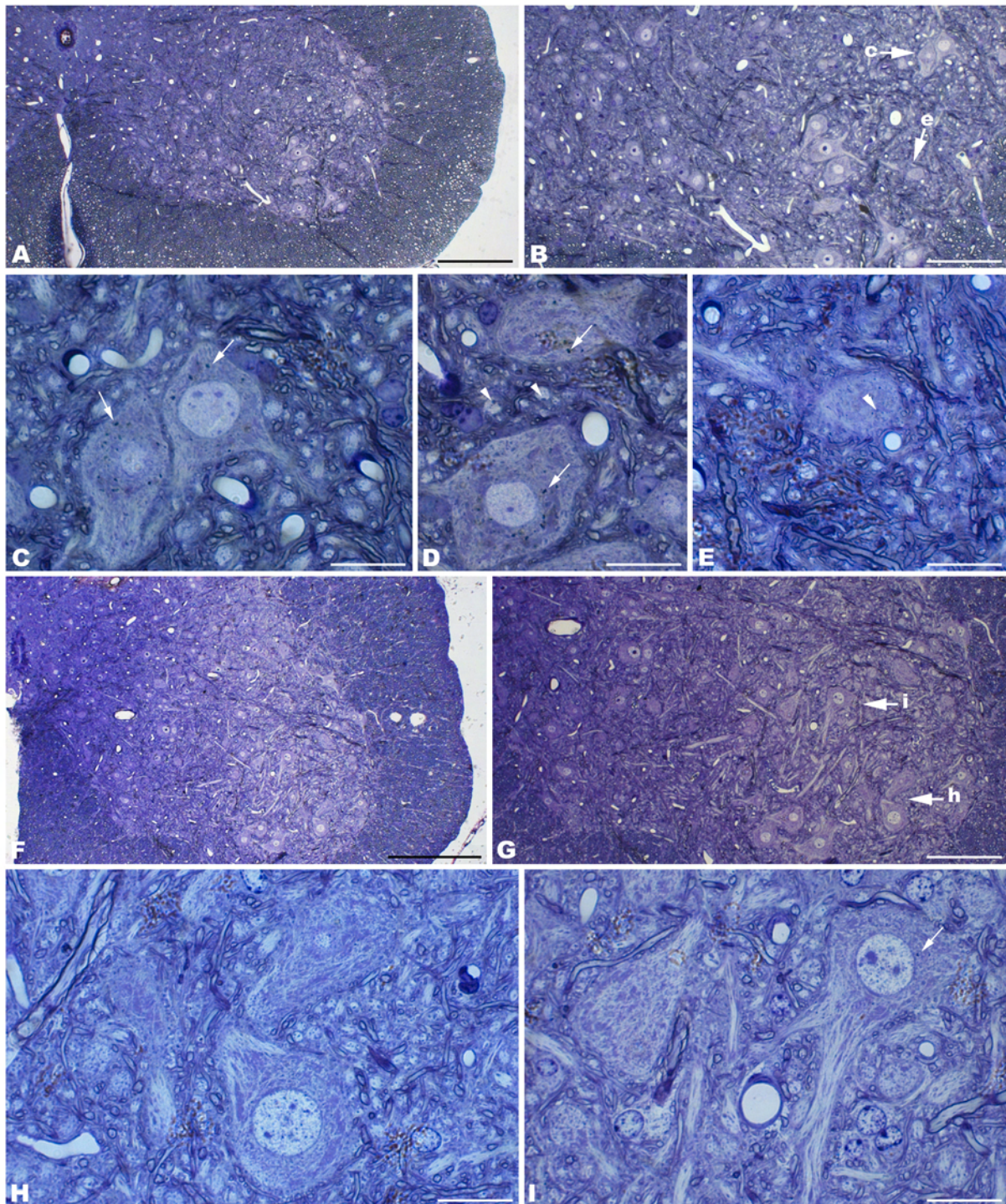


FIGURE 2 | Coronal sections through the spinal cord of 4- (A–E) and 1- (F–I) month-old *tbl/tbl* mice. In the older mutant mice, abundant dark accumulations are observable within the cytoplasm of the cell soma (arrows in **C,D**) and the dendrites (arrowheads in **D,E**) of the motor neurons. In contrast, few of these dark aggregates can be found in the younger animals (arrow in **I**). Bars = 200 μm (**A,F**), 100 μm (**B,G**), and 20 μm (**C–E,H,I**).

protective role of baseline autophagy (Mizushima, 2005) has been implicated in processes such as the astroglial response to inflammation, the dendritic growth, the maintenance of

adult neural stem cells, and synaptic plasticity (Kowalski et al., 2013; Nikolettou et al., 2015). The deregulation of autophagy has been implicated in the pathogenesis of a number

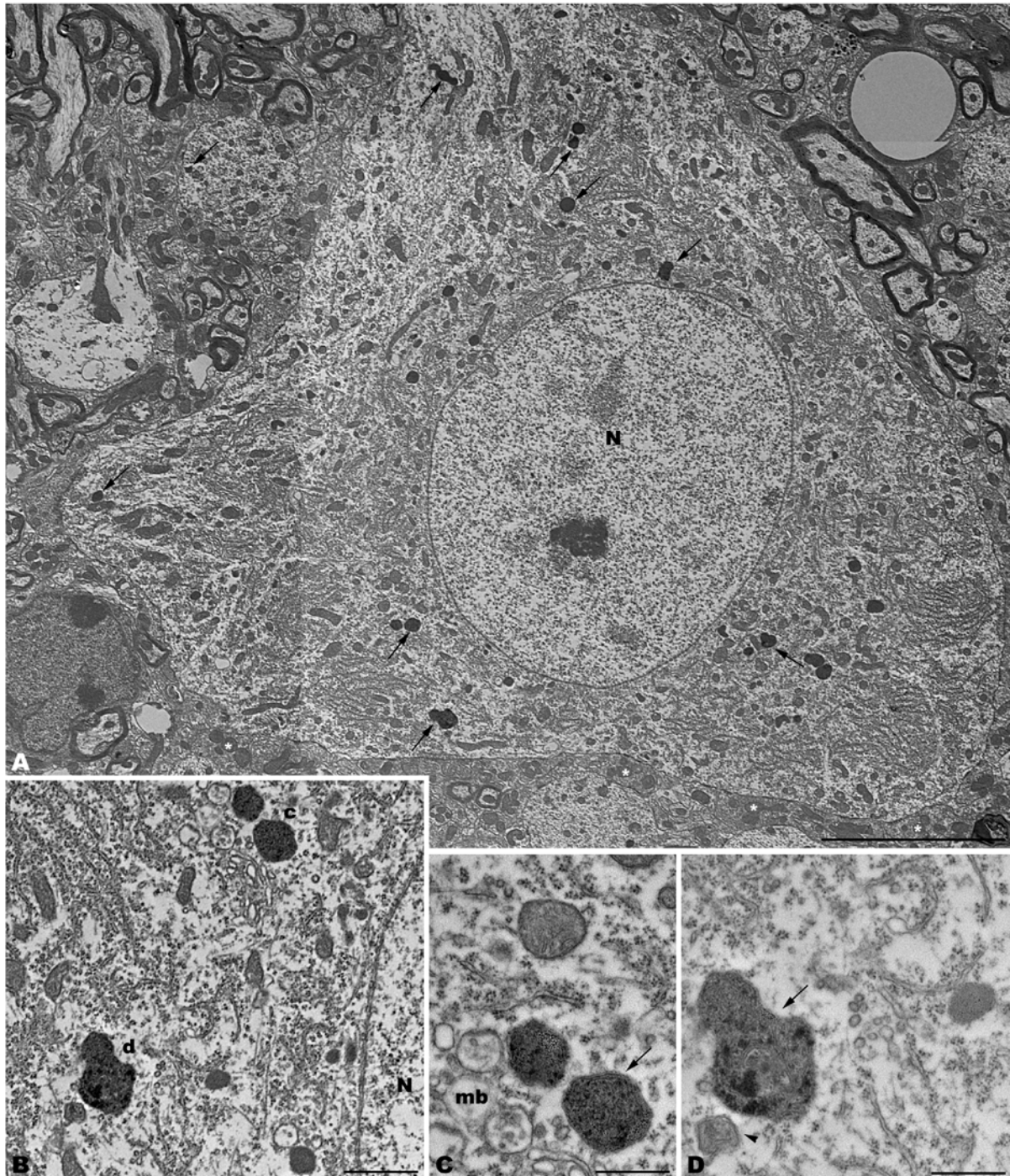


FIGURE 3 | Photomontage of a motor neuron from the spinal cord of a 4-month-old *tbl/tbl* mouse. Arrows indicate lysosomes with different degrees of evolution distributed throughout the cell soma and dendritic cytoplasm (A–D). Multivesicular bodies (mb), incipient autophagosomes (arrowhead), and empty vacuoles are often observed near the lysosomes (B–D). Note that axosomatic and axodendritic synapses present an unaltered morphology (asterisks in A). Bars = 5 μm (A), 1 μm (B), and 0.5 μm (C,D).

of neurodevelopmental diseases and adult neurodegenerative disorders (for a review, see Ghavami et al., 2014; Nikolettou et al., 2015; Wu et al., 2015). Another essential mechanism

for neuronal homeostasis is the protein degradation through the UPS pathway, whose alteration has also been implicated in the pathogenesis of several neurodegenerative diseases

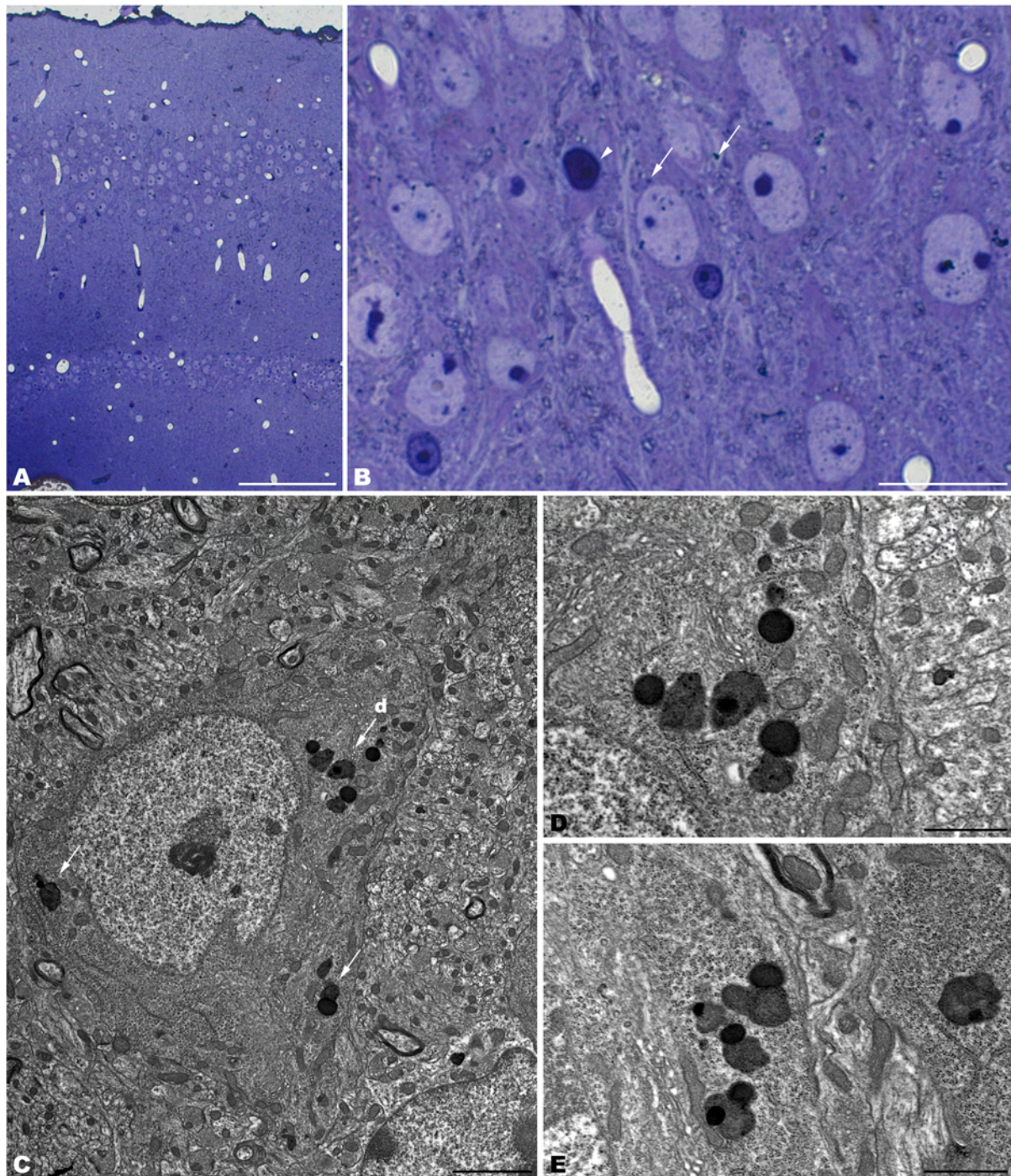
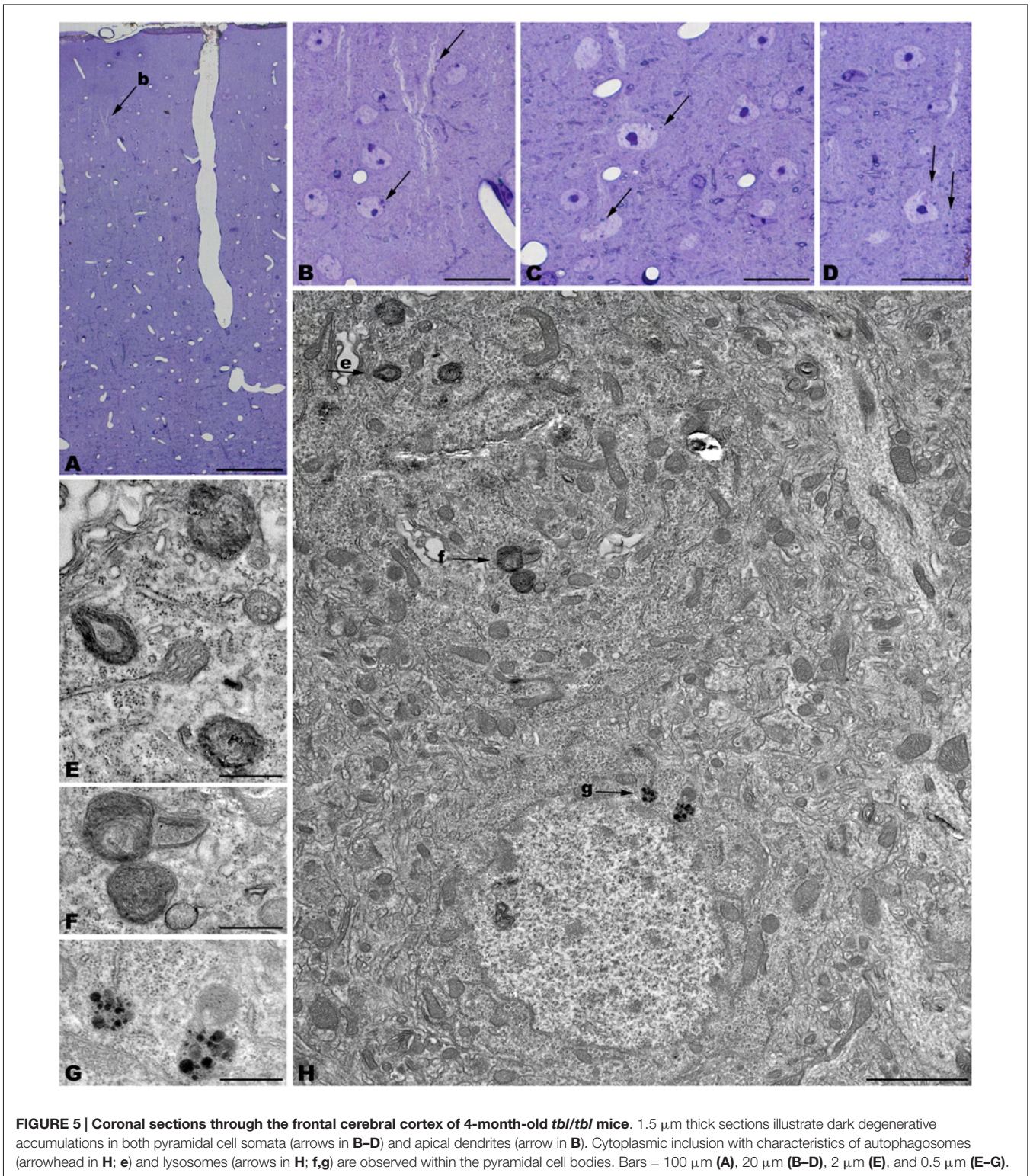


FIGURE 4 | Coronal sections through the CA3 of the hippocampus of 4-month-old *tbi/tbi* mice. 1.5 μm thick sections show dark degenerative accumulations in the pyramidal cell somata (arrows in **B**). Condensed dark nuclei are occasionally observed within the pyramidal cell layer (arrowhead in **B**). Dark accumulations and vacuoles found throughout pyramidal cell cytoplasm have the same ultrastructural features (arrows in **C–E**) as those found in Purkinje cells and spinal motor neurons. Bars = 100 μm (**A**), 20 μm (**B**), 2 μm (**C**), and 1 μm (**D–E**).

(de Vrij et al., 2004; Upadhy and Hegde, 2005; Rubinsztein, 2006; Hegde and Upadhy, 2007; Rusmini et al., 2007; Ramser et al., 2008; Chen et al., 2009; Deng et al., 2011; van Tijn

et al., 2012; Dlamini et al., 2013). The two processes are linked in their collaboration in cell proteostasis; in fact autophagic receptors interact with UPS via the ubiquitin association



domain (see Lim and Yue, 2015), and therefore the increase in autophagic activity observed here could be explained as the final expression of a deregulation of the UPS as occurs in *tbl/tbl* mutation (Mashimo et al., 2009).

Autophagy can be detected by different methods (Uchiyama et al., 2009; Li et al., 2014). Of these, the ultrastructural criteria defined by Clarke (1990) have to date proven to be one of the most useful. Thus, the observation of double-membrane-bound

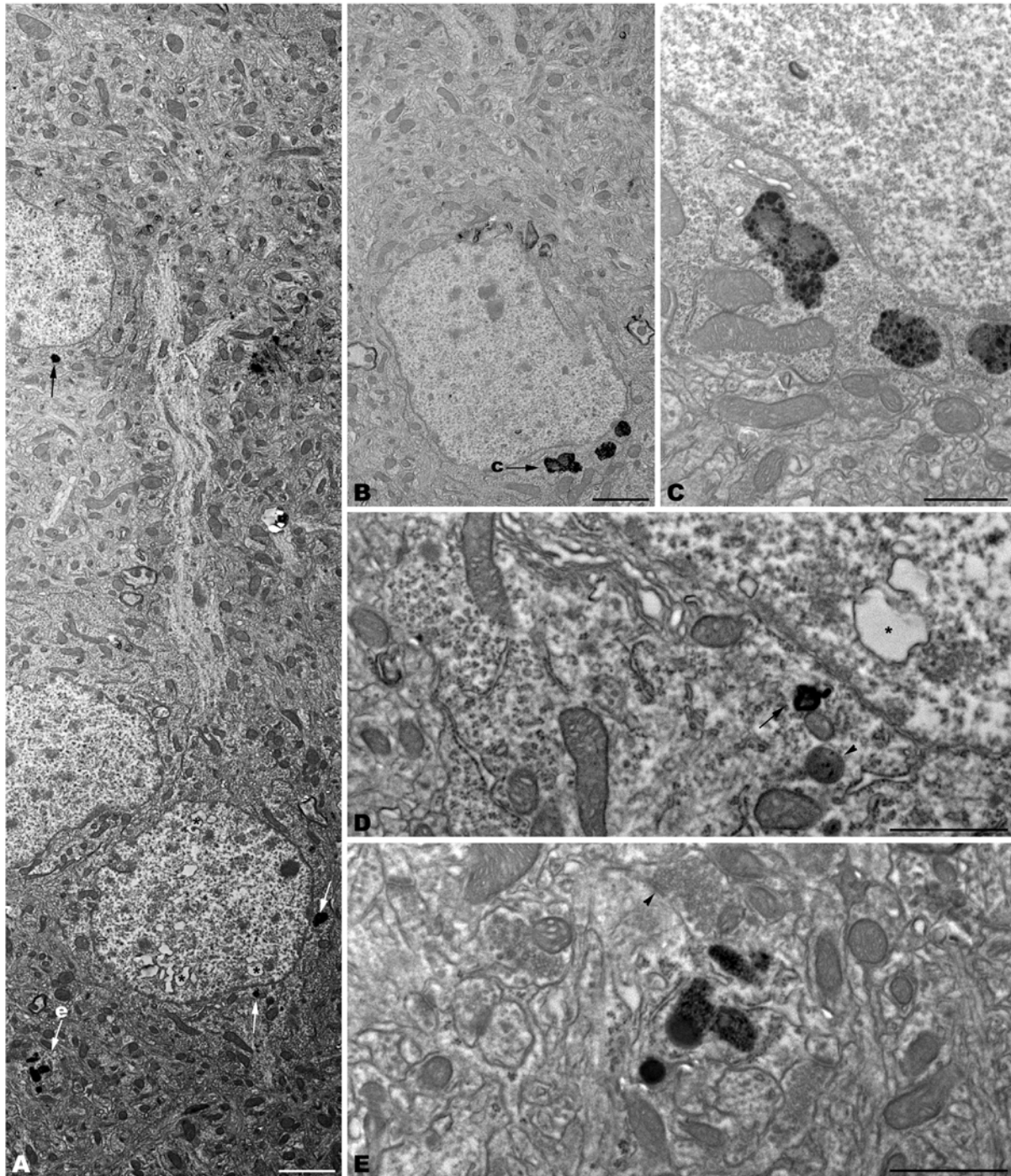


FIGURE 6 | Microphotographs of coronal sections through the frontal cerebral cortex of 4-month-old *tbi/tbi* mice. Lysosomes located within the cytoplasm of pyramidal cell somata (arrows in **A**; **B–D**) and dendrites (arrow in **A**; **e**) which receive synapses of normal appearance (arrowhead in **E**). Some pyramidal cells with lysosomes in their cytoplasm show vacuoles within their nuclei (asterisks in **A,D**). Bars = 2 μm (**A,B**) and 1 μm (**C–E**).

autophagic vacuoles—isolated or fused with lysosomes—is a clear indication of an autophagy active at the moment of fixation (see Figures 1, 3 in Clarke, 1990). This evidence is ratified by our immunohistochemical analyses, in which the

cytoplasmic location of markers of the autophagosomes cycle (see Franchi et al., 2012) coincides with those of the autophagic signs detected under the electron microscope. Earlier analysis dealing with the different mechanisms of cell death involved

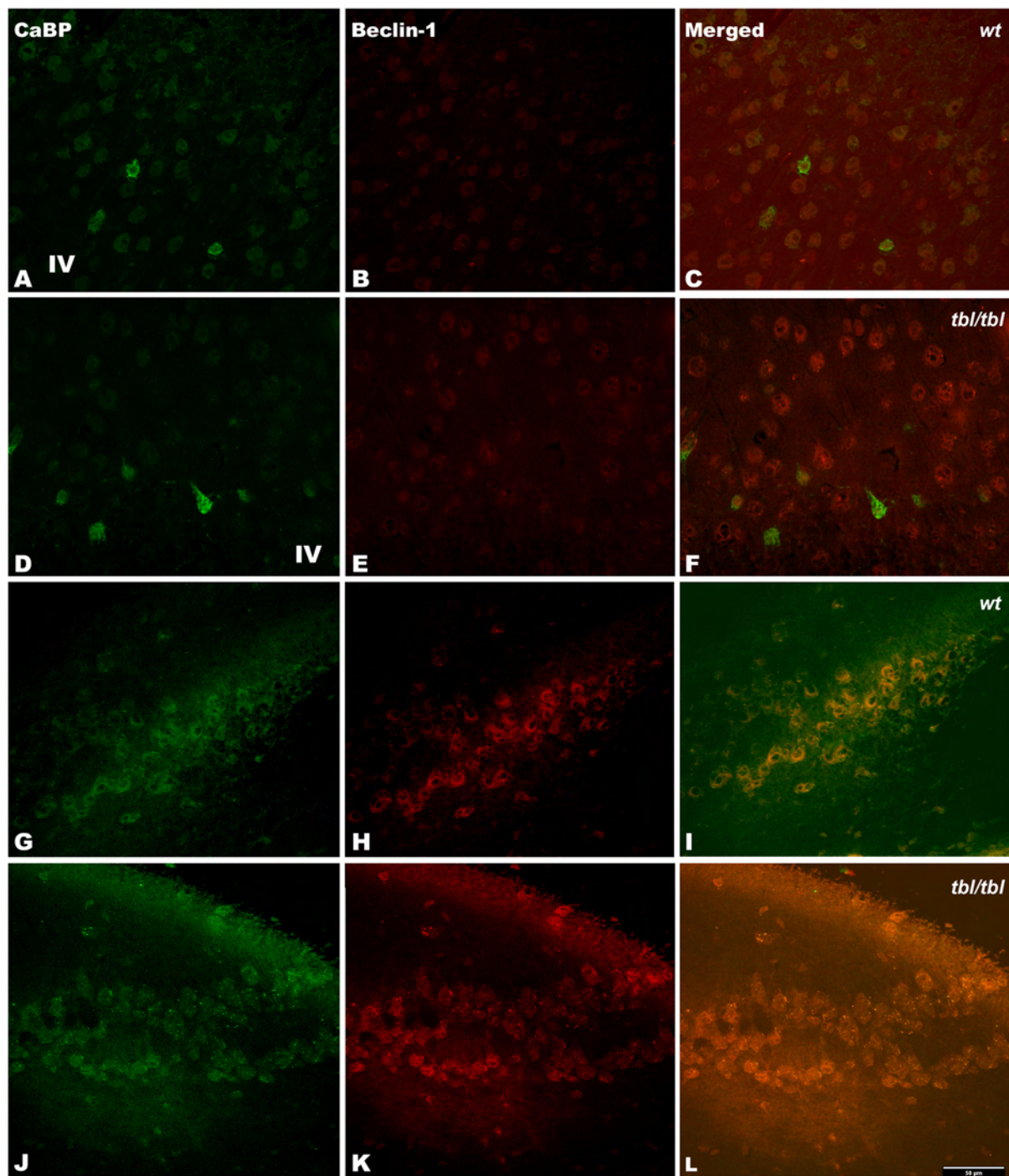


FIGURE 7 | Confocal images of coronal sections through the frontal cortex layers II-III (A-C) and CA3 hippocampus (G-I) of 4-month-old *wt* mice, and the same neocortical (D-F), and hippocampal region (J-L) of 4-month-old *tbl/tbl* mice. Beclin-1 expression is most pronounced in *tbl/tbl* brains (B,K), and as in *wt* co-express with calbindin (CaBP) immunoreactive and non-immunoreactive cell bodies (C,F,I,L). IV, layer IV. Bars = 50 μ m.

in mutant mice losing Purkinje cells demonstrated that *tbl/tbl* Purkinje cells died by autophagy (Dusart et al., 2006). Our results confirm and extend these observations to other neuronal cell types such as neocortical pyramidal neurons, CA3 hippocampal

pyramidal neurons, and spinal cord motor neurons, and suggest that the damage of UPS elicited by HERC1 E3 ubiquitin ligase is not circumscribed only to the cerebellum, but affects other brain regions. Immunohistochemistry allows an overall plane

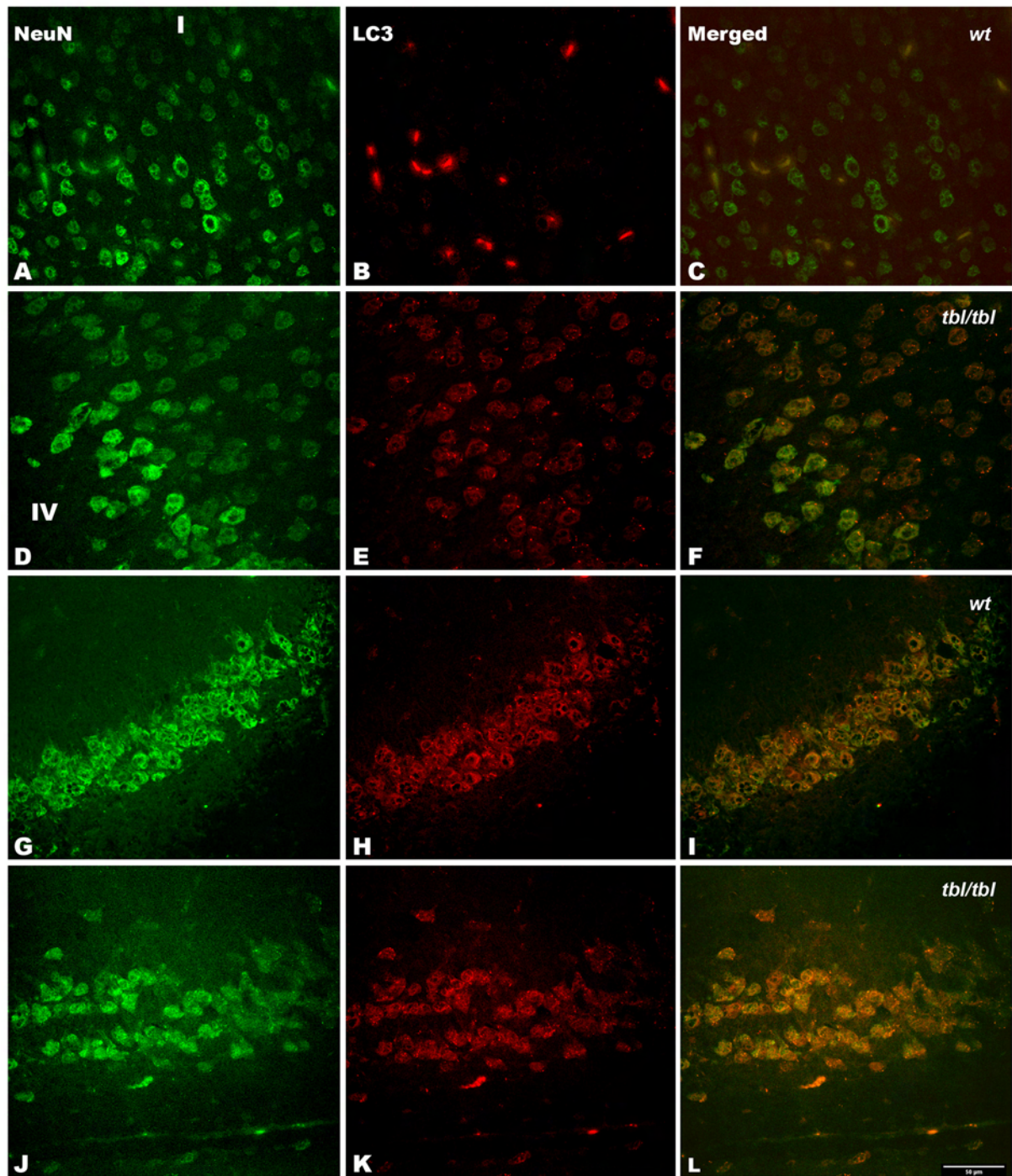


FIGURE 8 | Confocal images of coronal sections through the frontal cortex layers II-III (A-C) and CA3 hippocampus (G-I) of 4-month-old *wt* mice, and the same neocortical (D-F), and hippocampal region (J-L) of 4-month-old *tbl/tbl* mice. Light chain 3 (LC3) co-expression with the neuronal marker NeuN is also most pronounced in *tbl/tbl* brains (F,L) than in *wt* similar brain regions (C,I). I, layer I; IV, layer IV. Bar = 50 μ m.

of observation greater than electron microscopy regarding the type of neurons that are affected by the mutation. The few or none detection of autophagy markers in layers mostly occupied by interneurons such as the layer IV of the cerebral cortex (for

the cerebellum, see Dusart et al., 2006), in contrast with its abundance in layers II-III and V of the cerebral cortex in which pyramidal neurons are numerous, and the pyramidal layer of the CA3 of the hippocampus; together to the co-expression of

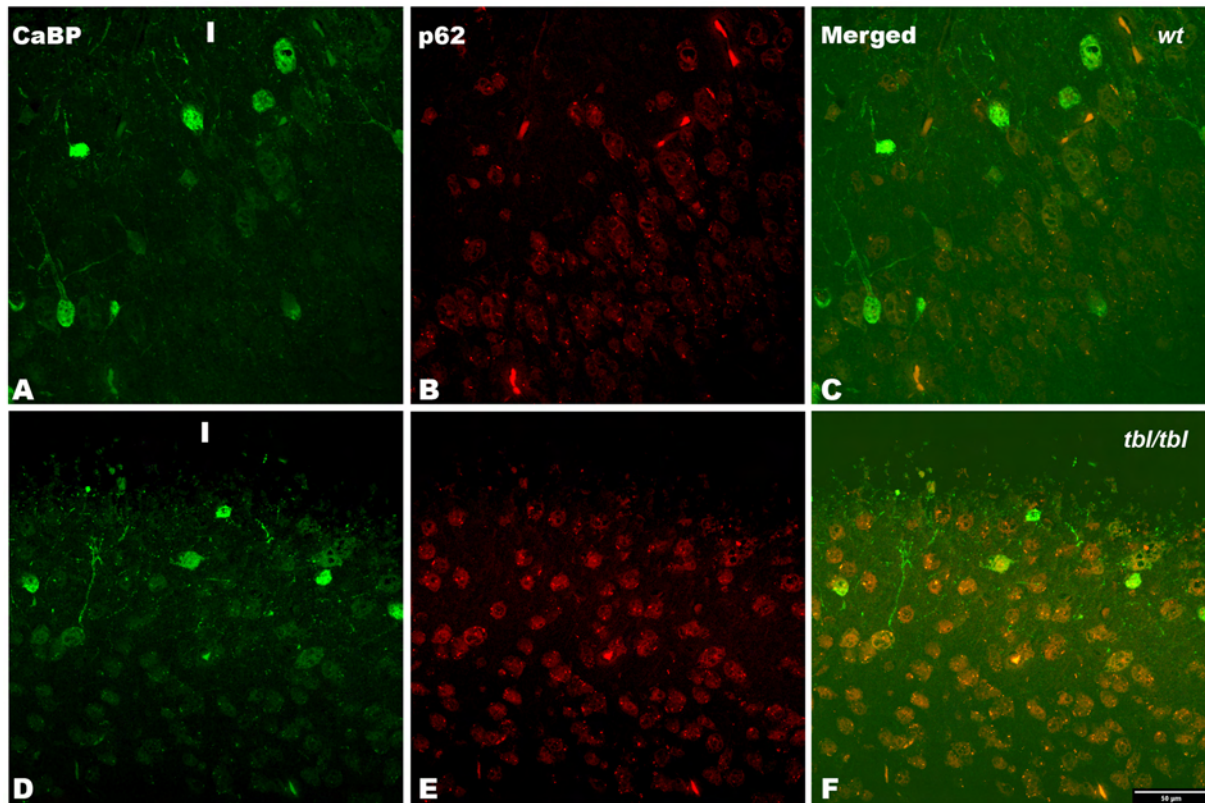


FIGURE 9 | Confocal images of coronal sections through the frontal cortex layers II-III (A–C) of 4-month-old *wt* mice, and the frontal cortex (D–F) of 4-month-old *tbl/tbl* mice. p62 immunoreactive is stronger in *tbl/tbl* cortex (E) than in *wt* cortex (B); and in both *wt* (C) and *tbl/tbl* (F) co-express in calbindin (CaBP) immunoreactive neuronal cell bodies. I, layer I. Bars = 50 μm .

analyzed markers with NeuN expressing cell bodies, open the possibility that one of the main targets of the mutation would be projection neurons. In fact, the ultrastructural features of autophagy-affected neurons observed here—i.e., characteristics of their chromatin, disposition of the Golgi apparatus and the rough endoplasmic reticulum, the typical morphology of the emergence of their apical dendritic shafts, etc. (see Peters et al., 1991)—corresponds to projection neurons.

Evidence points to the fact that protein homeostasis is affected by both synaptic and neuronal activity (for a review, see Lim and Yue, 2015). In addition, differences in autophagy have been found between several types of neuron (Lim and Yue, 2015; Nikolettou et al., 2015). Among the neurons most sensitive to induced autophagy are the cerebellar Purkinje cells (Dusart et al., 2006; Yue, 2007; Yue et al., 2008), the cortical neurons (Li et al., 2014), and the spinal cord motor neurons (Garcera et al., 2013; Zhang et al., 2013), the same neurons that are observed here. Taking these data together, it could be hypothesized that neurons receiving strong and varied inputs, and that possess a strong (intense) synaptic activity—as is the case of the projecting neurons observed here—will be more sensitive to *tbl/tbl* mutation than the rest of the neural cells. The vacuolization of the neuronal nucleus has been associated with several pathological conditions (see Sasaki et al., 2014), and may

be related to the alteration of normal Ca^{2+} homeostasis (Mattson et al., 2000; Alonso and García-Sancho, 2011). Therefore, it is possible to argue that an alteration in the homeostatic role of the autophagy in neurons receiving strong glutamatergic inputs (i.e., cortical pyramidal neurons) could affect neuronal cytoplasmic-nuclear relationships, ultimately promoting cell degeneration.

One of the characteristics of *tbl/tbl* mutation is the dramatic loss of Purkinje cells (Wassef et al., 1987; Rossi et al., 1995; Dusart et al., 2006; Mashimo et al., 2009; Porrás-García et al., 2013). Present results support previous observations and underline an important difference between the cerebellum and the other central nervous system regions analyzed. Thus, no clear signs of a significant neuronal cell loss were observed in the cerebral cortex, the hippocampus, or the spinal cord. Purkinje cells are among the neurons most commonly affected by spontaneous mutations (Sotelo, 1990; Dusart et al., 2006; for a review, see Porrás-García et al., 2013). Furthermore, directed mutations to components of the autophagic pathways present motor symptoms and Purkinje cell degeneration (Komatsu et al., 2006; Liang et al., 2010). In fact, on the basis of the autophagic reactions found in cerebellar mutant mice, Yue et al. (2008) proposed that neurons could develop axonal local autophagic processes as regulatory mechanisms that, in neurodegenerative diseases, could finally induce neuronal

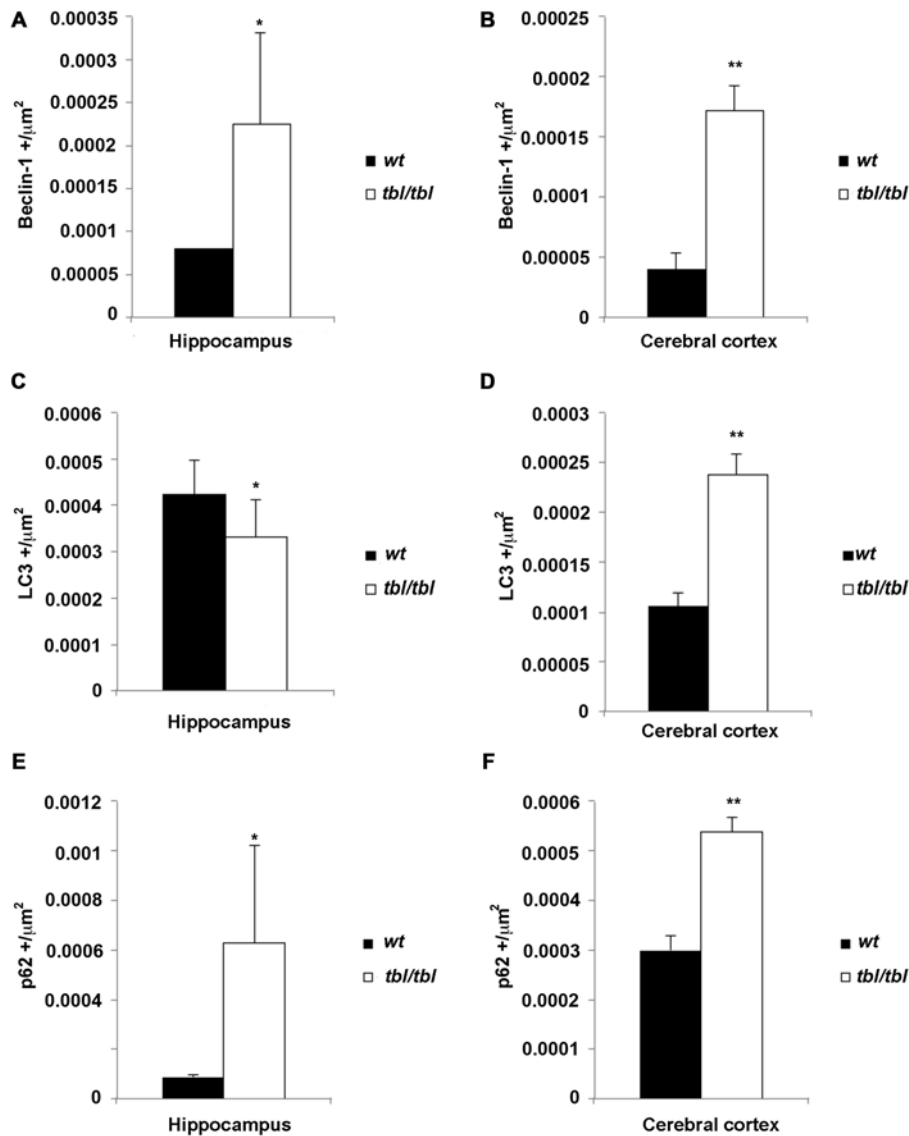


FIGURE 10 | Histograms of Beclin-1 (A,B), LC3 (C,D), and p62 (E,F) immunoreactivity densities through the CA3 hippocampus and frontal neocortex of 4-month-old *wt* mice (black bars), and the same brain regions of 4-month-old *tbl/tbl* mice (white bars). In the hippocampus the differences of immunoreactivity densities are not statistically significant (asterisks), being $p > 0.5$ for Beclin-1, $p = 0.440$ for LC3, and $p = 0.397$ for p62. In contrast, the differences of immunoreactivity densities are statistically significant for the three autophagic cycle markers in the cerebral cortex (double asterisks; $p = 0.019$ for Beclin-1, $p = 0.019$ for LC3, and $p = 0.017$ for p62).

death. Thus, in *Lurcher* mutants—in which Purkinje cells die as a result of the excitotoxicity elicited by the activity of mutated glutamate receptor $\Delta 2$ (GluR $\Delta 2^{Lc}$; Zuo et al., 1997; Yue et al., 2002)—there is an abnormal accumulation of autophagosomes in Purkinje cell axons before cell degeneration (Wang et al., 2006). This result seems to be consistent with the almost complete absence of autophagosomes, despite the axonopathy and subsequent Purkinje cell degeneration found in autophagic *Agt7*-gene-deficient mice (Komatsu et al., 2007). A common characteristic of both mutant mice is the presence of axonal swellings in Purkinje cells (Wang et al., 2006; Komatsu et al., 2007; Yue, 2007; Yue et al., 2008).

These axonal swellings—axonal torpedoes—were also found in *tbl/tbl* Purkinje cells before they died and disappeared (Rossi et al., 1995; Porrás-García et al., 2013). Therefore, our earlier and present observations are in accord with the hypothesis of Yue et al. (2008), and would indicate that, at least in Purkinje cell autophagic degeneration, there is a process of axonal damage before neuronal cell death, irrespective of the nature of the mutation. Whether autophagic signs found in the rest of the projecting neurons analyzed here indicate that autophagy is playing its homeostatic role and ultimately slowing down or inhibiting neuronal death needs further analysis.

In conclusion, our results extend the effect of the HERC1 E3 ubiquitin ligase-*tbl* mutation to projecting neurons of the cerebral neocortex, the CA3 of the hippocampus, and the ventral horn of the spinal cord, which seem to be less sensitive than Purkinje cells to the mutation. Further behavioral and morphometric studies are needed to elucidate the degree to which their neuronal circuits are affected in *tbl/tbl* mutant mice.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RR and EMP-V contributed equally in this research. SB performed the confocal and statistical analyses. All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data. RR, EMP-V, and JAA conceived and designed the study. RR, EMP-V, and JAA performed the experiments. RR and EMP-V were the primary contributors to the electron microscopy observations. SB and JAA performed the confocal analyses. SB performed the statistical analysis. JLR performed and bred the tambaleante mutation. JAA prepared the figures and wrote the article. All authors approved the article.

REFERENCES

- Alonso, M. T., and García-Sancho, J. (2011). Nuclear Ca^{2+} signaling. *Cell Calcium* 49, 280–289. doi: 10.1016/j.ceca.2010.11.004
- Bachiller, S., Rybkina, T., Porrás-García, E., Pérez-Villegas, E., Tabares, L., Armengol, J. A., et al. (2015). The HERC1 E3 ubiquitin ligase is essential for normal development and for neurotransmission at the mouse neuromuscular junction. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 2961–2971. doi: 10.1007/s00018-015-1878-2
- Bredesen, D. E., Rao, R. V., and Mehlen, P. (2006). Cell death in the nervous system. *Nature* 443, 796–802. doi: 10.1038/nature05293
- Chen, P. C., Qin, L. N., Li, X. M., Walters, B. J., Wilson, J. A., Mei, L., et al. (2009). The proteasome-associated deubiquitinating enzyme Usp14 is essential for the maintenance of synaptic ubiquitin levels and the development of neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 29, 10909–10919. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2635-09.2009
- Clarke, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl)* 181, 195–213. doi: 10.1007/bf00174615
- Deng, H. X., Chen, W., Hong, S. T., Boycott, K. M., Gorrie, G. H., Siddique, N., et al. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477, 211–215. doi: 10.1038/nature10353
- de Vrij, F. M., Fischer, D. F., van Leeuwen, F. W., and Hol, E. M. (2004). Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Prog. Neurobiol.* 74, 249–270. doi: 10.1016/j.pneurobio.2004.10.001
- Dlamini, N., Josifova, D. J., Paine, S. M., Wraige, E., Pitt, M., Murphy, A. J., et al. (2013). Clinical and neuropathological features of X-linked spinal muscular atrophy (SMAX2) associated with a novel mutation in the UBA1 gene. *Neuromuscul. Disord.* 23, 391–398. doi: 10.1016/j.nmd.2013.02.001
- Dunn, W. A. Jr. (1990a). Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110, 1923–1933. doi: 10.1083/jcb.110.6.1923
- Dunn, W. A. Jr. (1990b). Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110, 1935–1945. doi: 10.1083/jcb.110.6.1935
- Dusart, I., Guenet, J. L., and Sotelo, C. (2006). Purkinje cell death: differences between developmental cell death and neurodegenerative death in mutant mice. *Cerebellum* 5, 163–173. doi: 10.1080/14734220600699373
- Franchi, L., Muñoz-Planillo, R., and Nuñez, G. (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat. Immunol.* 13, 325–332. doi: 10.1038/ni.2231

FUNDING

Authors are supported as follows: RR (Juan de la Cierva contract JCI-2011-08888 from the MINECO and VPPI-US from the University of Seville), EMP-V (DGICYT BFU2011-27207, and Spanish Junta de Andalucía CTS-2257), SB (Fundación Ramón Areces), JLR (Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación Grant BFU2011-22498), and JAA (Subv. CEICE Excelencia 2012 BIO 1388, Delgado García, José María).

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the Servicio de Anatomía Patológica of the H.U. Virgen Macarena of Seville for its generous cession of the Leica EM UC6, and to the CITIUS of the University of Seville for the facilities to use the Libra 120 EM. Technical assistance of F.J. García-Reyes and T. Rybkina is also greatly appreciated. We are also indebted to J.A. Sánchez-Alcazar for its generous gift of LC3, p62 and beclin-1 antibodies. Criticism to the manuscript by J.M. Delgado-García, and English style revision by R. Churchill is also acknowledged.

- Garcera, A., Bahi, N., Periyakarupiah, A., Arumugam, S., and Soler, R. M. (2013). Survival motor neuron protein reduction deregulates autophagy in spinal cord motoneurons *in vitro*. *Cell Death Dis.* 4:e686. doi: 10.1038/cddis.2013.209
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J. R., Mehrpour, M., et al. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog. Neurobiol.* 112, 24–49. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.004
- Hegde, A. N., and Upadhyay, S. C. (2007). The ubiquitin-proteasome pathway in health and disease of the nervous system. *Trends Neurosci.* 30, 587–595. doi: 10.1016/j.tins.2007.08.005
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.* 2, 330–335. doi: 10.1093/embo-reports/kve061
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880–884. doi: 10.1038/nature04723
- Komatsu, M., Wang, Q. J., Holstein, G. R., Friedrich, V. L. Jr., Iwata, J.-I., Kominami, E., et al. (2007). Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 14489–14494. doi: 10.1073/pnas.0701311104
- Kowalski, J. R., Dube, H., Touroutine, D., Rush, K. M., Goodwin, P. R., Carozza, M., et al. (2013). The Anaphase-Promoting Complex (APC) ubiquitin ligase regulates GABA transmission at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Mol. Cell. Neurosci.* 58, 62–75. doi: 10.1016/j.mcn.2013.12.001
- Li, L., Zhang, Q., Tan, J., Fang, Y., An, X., and Chen, B. (2014). Autophagy and hippocampal neuronal injury. *Sleep Breath.* 18, 243–249. doi: 10.1007/s11325-013-0930-4
- Liang, C. C., Wang, C., Peng, X., Gan, B., and Guan, J. L. (2010). Neural-specific deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration. *J. Biol. Chem.* 285, 3499–3509. doi: 10.1074/jbc.M109.072389
- Lim, J., and Yue, Z. (2015). Neuronal aggregates: formation, clearance and spreading. *Dev. Cell* 32, 491–501. doi: 10.1016/j.devcel.2015.02.002
- Mashimo, T., Hadjebi, O., Amair-Pinedo, F., Tsurumi, T., Langa, F., Serikawa, T., et al. (2009). Progressive Purkinje cell degeneration in tambaleante mutant mice is a consequence of a missense mutation in HERC1 E3 ubiquitin ligase. *PLoS Genet.* 5:e1000784. doi: 10.1371/journal.pgen.1000784
- Mattson, M. P., LaFerla, F. M., Chan, S. L., Leissring, M. A., Shepel, P. N., and Geiger, J. D. (2000). Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 23, 222–229. doi: 10.1016/s0166-2236(00)01548-4

- Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ.* 12, 1534–1541. doi: 10.1038/sj.cdd.4401728
- Nikoletopoulou, V., Papandreou, M.-E., and Tavernarakis, N. (2015). Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death Differ.* 22, 398–407. doi: 10.1038/cdd.2014.204
- Peters, A., Palay, S. L., and Webster, H. D. F. (1991). *The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and their Supporting Cells*. 3rd Edn. New York: Oxford University Press.
- Porras-García, M. E., Ruiz, R., Pérez-Villegas, E. M., and Armengol, J. A. (2013). Motor learning of mice lacking cerebellar Purkinje cells. *Front. Neuroanat.* 7:4. doi: 10.3389/fnana.2013.00004
- Ramser, J., Ahearn, M. E., Lenski, C., Yariz, K. O., Hellebrand, H., von Rhein, M., et al. (2008). Rare missense and synonymous variants in UBE1 are associated with X-linked infantile spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 188–193. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.09.009
- Rossi, F., Jankovski, A., and Sotelo, C. (1995). Target neuron controls the integrity of afferent axon phenotype: a study on the Purkinje cell-climbing fiber system in cerebellar mutant mice. *J. Neurosci.* 15, 2040–2056.
- Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443, 780–786. doi: 10.1038/nature05291
- Rusmini, P., Sau, D., Crippa, V., Palazzolo, I., Simonini, F., Onesto, E., et al. (2007). Aggregation and proteasome: the case of elongated polyglutamine aggregation in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurobiol. Aging* 28, 1099–1111. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.015
- Sasaki, S., Yamashita, T., Hideyama, T., and Kwak, S. (2014). Unique nuclear vacuoles in the motor neurons of conditional ADAR2-knockout mice. *Brain Res.* 1550, 36–46. doi: 10.1016/j.brainres.2014.01.006
- Sotelo, C. (1990). Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J. Exp. Biol.* 153, 225–249.
- Uchiyama, Y., Koike, M., Shibata, M., and Sasaki, M. (2009). Autophagic neuron death. *Methods Enzymol.* 453, 33–51. doi: 10.1016/S0076-6879(08)04003-2
- Upadhyay, S. C., and Hegde, A. N. (2005). Ubiquitin-proteasome pathway components as therapeutic targets for CNS maladies. *Curr. Pharm. Des.* 11, 3807–3828. doi: 10.2174/138161205774580651
- van Tijn, P., Dennissen, F. J., Gentier, R. J., Hobo, B., Hermes, D., Steinbusch, H. W., et al. (2012). Mutant ubiquitin decreases amyloid beta plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 61, 739–748. doi: 10.1016/j.neuint.2012.07.007
- van Tijn, P., Hol, E. M., van Leeuwen, F. W., and Fischer, D. F. (2008). The neuronal ubiquitin-proteasome system: murine models and their neurological phenotype. *Prog. Neurobiol.* 85, 176–193. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.03.001
- Wang, Q. J., Ding, Y., Kohtz, S., Mizushima, N., Cristea, I. M., Rout, M. P., et al. (2006). Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J. Neurosci.* 26, 8057–8068. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2261-06.2006
- Wassef, M., Sotelo, C., Cholley, B., Brehier, A., and Thomasset, M. (1987). Cerebellar mutations affecting the postnatal survival of Purkinje cells in the mouse disclose a longitudinal pattern of differentially sensitive cells. *Dev. Biol.* 124, 379–389. doi: 10.1016/0012-1606(87)90490-8
- Wu, H.-J., Pu, J.-L., Krafft, P. R., Zhang, J.-M., and Chen, S. (2015). The molecular mechanisms between autophagy and apoptosis: potential pole in central nervous system disorders. *Cell. Mol. Neurobiol.* 35, 85–99. doi: 10.1007/s10571-014-0116-z
- Yue, Z. (2007). Regulation of neuronal autophagy in axon: implication of autophagy in axonal function and dysfunction/degeneration. *Autophagy* 3, 139–141. doi: 10.4161/auto.3602
- Yue, Z., Horton, A., Bravin, M., DeJager, P. L., Selimi, F., and Heintz, N. (2002). A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron* 35, 921–933. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00861-9
- Yue, Z., Wang, Q. J., and Komatsu, M. (2008). Neuronal autophagy: going the distance to the axon. *Autophagy* 4, 94–96. doi: 10.4161/auto.5202
- Zhang, H.-Y., Wang, Z.-G., Wu, F.-Z., Kong, X.-X., Yang, J., Lin, B.-B., et al. (2013). Regulation of autophagy and ubiquitinated protein accumulation by bFGF promotes functional recovery and neural protection in a rat model of spinal cord injury. *Mol. Neurobiol.* 48, 452–464. doi: 10.1007/s12035-013-8432-8
- Zuo, J., DeJager, P. L., Takahashi, K. A., Jiang, W., Linden, D. J., and Heintz, N. (1997). Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in d2 glutamate receptor. *Nature* 388, 769–773. doi: 10.1038/42009

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Ruiz, Pérez-Villegas, Bachiller, Rosa and Armengol. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

25

26

27 **Abstract**

28 The alteration in HERC1 function in *tambaleante* (*tbl*) mice provokes a reduction in the
29 number of vesicles available to be released at the Neuromuscular Junction (NMJ). The
30 exact mechanisms involved in NMJ development and functional impairment in *tbl* mice
31 are unknown. The aim of this work was to study the implication of glial cells in *tbl*
32 mutant mice motor alteration. Our results show that the mutant mice display a delay of
33 the evoked synaptic response. Additionally, we found a significant increment of
34 phosphorylated Akt associated with alterations in axon wrapping and myelin sheath
35 thickness of the sciatic nerve. Herein, we propose a molecular model that could explain
36 how HERC1 mutation in *tbl* mice affects the peripheral nervous system. Finally, since
37 the myelin abnormalities found in *tbl* mice are histological hallmarks of neuropathic
38 periphery disease, *tbl* mutant mice could be considered as a new mouse model for
39 these diseases.

40 **Key words:** HERC1, myelin, proteasome, Akt, axon, Peripheral Nervous System,
41 neuropathic disease, Charcot-Marie-Tooth

42

43

44

45

46

47

49 The *tambaleante* (*tbl*) mutant mice present tremor, unstable gait, abnormal posture of
50 the hind limbs, together with loss of Purkinje cells in the cerebellum^{1, 2, 3, 4}. Recently,
51 we described an earlier motor performance impairment to the cerebellar
52 neurodegeneration, consisting of a reduction of the motor end-plate area, less efficient
53 neuromuscular activity *in vivo*, and an impaired evoked neurotransmitter release⁵. The
54 genetic basis of this complex phenotype is a single nucleotide transition at position
55 1448 within the *Herc1* gene. This change generates an overexpress mutated protein
56 with an amino acid substitution Gly483Glu that triggers all these alterations¹.

57 HERC1 (HECT domain and RCC1 domain) E3 ubiquitin ligase protein belongs to
58 the ubiquitin–proteasome system (UPS)^{6, 7, 8}. UPS plays a key role in the protein
59 degradation pathway essential for neuronal homeostasis. It has been postulated, that
60 alterations in the UPS pathway are involved in the pathogenesis of several
61 neurodegenerative disorders including neuromuscular diseases such as spinal
62 muscular atrophy (SMA), spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), X-spinal
63 muscular atrophy, and X-linked juvenile and adult-onset Amyotrophic Lateral Sclerosis
64 (ALS)^{9, 10, 11, 12, 13}. Likewise, alteration in this pathway is involved in severe forms of
65 peripheral neuropathies such as Charcot-Marie-Tooth disease (CMT)^{14, 15, 16}.

66 There is growing evidence that nonneuronal cells play a key role in
67 neurodegenerative processes¹⁷. Indeed, glial cells collaborate in the functionality of
68 neurons in both the central and peripheral nervous systems. Recent studies described
69 a glial alteration component in the development of neuromuscular diseases such as
70 ALS and SMA^{18, 19}. In fact, restoration of the Survival Motor Neuron protein (SMN) in
71 Schwann cells improves motor alterations observed in the mouse model of SMA²⁰.
72 Interestingly, one of the altered systems in the Schwann cells in this mouse model is
73 the UPS¹³. All together, these previous results lead us to investigate the glial cell

74 component in the *tbl* mutant mice using a range of *in vitro* approaches. In this work, we
75 describe a defective location of the Schwann cells cytoplasmic prolongations at the
76 NMJ, and a severe alterations in axon wrapping and myelin sheath thickness
77 myelination in the *tbl* mutant mice. These changes seems to be closely related to the
78 dysregulation of the Akt signal pathway in *tbl* mutant mice.

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98 **Materials and methods**

99 *Animal model*

100 The experimental mice were obtained by breeding pairs of *tambaleante* mutation
101 carriers. Control and mutant mice (*tbl*) were genotyped by PCR as described previously
102 ¹. The control mice used were age-matched littermates of the mutants (2-4 month of
103 age). All experiments were performed according to current Spanish legislation RD
104 53/2013 governing experimental animal care (BOE 08/02/2013).

105 *Intracellular recording and analysis*

106 Mice were anesthetized with tribromethanol 2% and sacrificed by exsanguination. The
107 *Levator Auris Longus* (LAL) muscle was dissected out with its nerve branches intact
108 and pinned to the bottom of a 2 ml chamber on a bed of cured silicone rubber (Sylgard,
109 Dow Corning). These preparations were perfused continuously with the following
110 solution (in mM): 125 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, and 30 glucose. This
111 solution was continuously gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ to maintain its pH at 7.4.
112 Recordings were obtained at room temperature (22–23°C). *Ex vivo* electrical
113 stimulation was performed by mean a suction electrode, applying 10 stimuli at 100 Hz
114 (0.2 ms square-wave pulses; 2–40 V amplitude). Evoked end-plate potentials (EPPs)
115 were recorded and analyzed as described previously ^{21, 22, 23, 24}. Muscle contractions
116 were blocked with μ -conotoxin GIIIB (2–4 μ M; Alomone Labs), a specific blocker of
117 skeletal muscle voltage-gated sodium channels. Latency, meaning the elapsed time
118 between stimulation and postsynaptic response, was measured as the time from the
119 positive peak of the artifact to the 10% onset of the postsynaptic event.

120 *Immunofluorescence*

121 Whole-mount LAL muscles were incubated for 90 min in 4% paraformaldehyde and
122 immunostained as described previously^{5, 25}. Briefly, the muscles were bathed in 0.1 M
123 glycine in PBS for 30 min, permeabilized with 1% (v/v) Triton X-100 in PBS for 1 h, and
124 then incubated in 5% (w/v) BSA, 1% Triton X-100 in PBS for 1 h, to prevent unspecific
125 staining. The tissue was then incubated overnight at 4 °C with the following primary
126 antibodies against presynaptic and glial proteins: Neurofilaments (NF; 1:500),
127 Synaptophysin (SYP; 1:500) and Myelin Basic Protein (MBP; 1:500) from Santa Cruz
128 Biotechnology and S100 β (1:250) from GeneTex. Next day, the muscles were rinsed
129 for 1 h in PBS containing 0.05% Triton X-100. After incubating for 1 h with the
130 corresponding secondary antibodies (1:500; Alexa antibodies, Invitrogen) and 10 ng/ml
131 rhodamine-Bungarotoxin (BTX) (Sigma Aldrich) to label the postsynaptic terminal, and
132 rinsing again with PBS containing 0.05% Triton X-100 for 90 min, the muscles were
133 mounted in 50% Glycerol for visualization. Fixed muscles were examined on an upright
134 Leica DM 2500 confocal laser scanning microscope using a 63x oil-immersion
135 objective with a numerical aperture of 1.3. Images from control and mutant littermates
136 were obtained under similar conditions (laser intensities and photomultiplier voltages),
137 and usually on the same day. Morphometric analysis of the fluorescently labeled
138 structures was performed offline with Fiji ImageJ (W. Rasband, National Institutes of
139 Health).

140 *Western blot*

141 Sciatic nerve proteins were obtained by mean of TRIsure® method following the
142 indications of the manufacturer (Bioline). Protein content of the samples was estimated
143 according to the Bradford method using BSA standards with the Pierce BCA Protein
144 Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)²⁶, and loading 30-60 μ g of protein in each lane.
145 Protein samples were separated by SDS-PAGE (10%), and transferred to a
146 nitrocellulose membrane (Biorad). Membranes were exposed to blocking buffer (5%
147 milk in Tris-Buffer Saline (TBST): 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl and 0.05%

148 Tween-20) for 1 h at room temperature. Then, membranes were incubated overnight at
149 4°C in blocking buffer (5% milk in Tris-Buffer Saline) containing the primary antibodies:
150 anti-MBP (1:500) or anti-p-Akt (ser473) (1:500) (Santa Cruz). GAPDH antibody (Santa
151 Cruz; 1:1000) was used as a loading control. After incubation with the primary
152 antibodies, all membranes were washed in TBST and, incubated with peroxidase-
153 conjugated anti-immunoglobulin secondary antibodies (DAKO, Produktionsvej, DK) at a
154 dilution of 1:2500 for 1 h at room temperature in TBST. Proteins were visualized using
155 western blotting chemiluminescence luminal reagent kit Western Clarity™ ECL
156 Substrate (Bio-Rad). All experiments were repeated at least two times. The bands were
157 analyzed by densitometry using the Fiji ImageJ gel analyzer (W. Rasband, National
158 Institutes of Health). The bands were quantified as percent of GAPDH expression.

159 *Electron microscopy*

160 Mice were deeply anaesthetized with tribromoethanol 2%, i.p., and perfused
161 transcardially with a mixture of 1% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.12 M
162 phosphate buffer (PB, pH 7.2). Thereafter, the LAL muscle and sciatic nerve were
163 dissected out and immersed overnight in the same fixative buffer. Longitudinal and
164 transversal slices were cut and incubated in 2% OsO₄ in PB, stained in a block with
165 ethanolic 0.5% uranyl acetate, dehydrated with an increased gradient of ethanol, and
166 embedded in Durcupan® (Fluka). Ultrathin sections were obtained on a Leica EM UC7
167 ultramicrotome, collected on copper grids (150 and 300 mesh) and observed without
168 counterstaining in a Zeiss Libra EM at 80 kV (CITIUS, University of Seville).

169 *Statistical analysis*

170 The results were analyzed with the SPSS package for Windows and unless otherwise
171 stated, the data represent the mean ± SEM values. To compare quantitative variables
172 among *tambaleante* and control samples we used the Student's t-test (unless
173 otherwise stated). A P-value < 0.05 was considered statistically significant. N = number

174 of mice, n = number of NMJ or number of fibers. All the data represent the analysis of
175 at least three animals per genotype as previously performed ²⁷.

176

177 **Results**

178 **Evoked release latency is increased in *tambaleante* terminals**

179 A previous study described that the neurotransmitter release in *tambaleante* (*tbl*) mice
180 was altered in the NMJ ⁵. To elucidate if the conduction of the action potential is also
181 affected in this mouse model, we measured the latency between the nerve stimulation
182 and the evoked postsynaptic response. The *tbl* mice showed a higher latency than
183 littermate controls (Control: 1.27 ± 0.12 ms, (n, N = 24, 3); *tbl*: 1.68 ± 0.08 ms, (n, N =
184 30, 4); P = 0.02) (Fig. 1A & B). Furthermore, during the stimulus train, there was
185 progressive prolongation of this latency (delta delay) in both, mutant and control mice
186 (Fig. 1A & C). The average latency increment by the tenth EPP was almost two fold
187 longer in mutants terminals than in controls (Control: 0.14 ± 0.03 ms, (n, N = 24, 3); *tbl*:
188 0.26 ± 0.05 ms, (n, N = 30, 4); P = 0.04) (Fig. 1C).

189 **Non-myelinating Schwann cells invade the synaptic cleft of the NMJ in** 190 ***tambaleante***

191 A possible reason for the EPP delay increment during the stimulation train could be the
192 slowing in the conduction velocity of the axonal action potential and/or its passive
193 propagation into the nonmyelinated regions of the pre-terminal ^{23, 28, 29}. To further
194 investigate this possibility, we immunohistochemically studied the glial cells of the NMJ.
195 Labelling of the non-myelinating glial cells with S100 β antibody showed a miss-location
196 of this marker at the *tbl* NMJ (Fig. 2A). In orthogonal view, we observed that labelled
197 Schwann cells (magenta) interposed between pre- (green) and post-synaptic (red)
198 terminals in *tbl* NMJs. The BTX area, as we reported before ⁵, was smaller in *tbl* NMJ

199 than in controls (Fig. 2B) (Control: $309.92 \pm 22.04 \mu\text{m}^2$, (n, N = 38, 3); *tbl*: $227.57 \pm$
200 $16.77 \mu\text{m}^2$, (n, N = 39, 3); $P = 0.041$). However, there were not significant differences in
201 the S100 β area between both groups ($P = 0.09$) (Fig. 2C). Furthermore, the
202 quantification of the mean intensity in the *tbl* terminal showed a significant increment of
203 S100 β in comparison with controls (Control: 25.17 ± 4.1 a.u., (n, N = 38, 3); *tbl*: $46.23 \pm$
204 2.66 a.u., (n, N = 39, 3); $P = 0.023$) (Fig. 2D). To test if this result could be due to an
205 increment in permeability of the *tbl* muscle during the immunostaining protocol, we
206 compared the mean intensity of the BTX labelling. As we did not find any difference
207 between groups (Fig. 2E) ($P = 0.84$), this possibility is unlikely. In addition, when the
208 mean S100 β intensity was normalized with respect to BTX area, the level of intensity in
209 mutants terminals was higher than controls (Control: 0.096 ± 0.02 , (n, N = 38, 3); *tbl*:
210 0.24 ± 0.03 a.u., (n, N = 39, 3); $P = 0.02$) (Fig. 2F). These results suggest that the non-
211 myelinating glial component of the NMJ displays miss-location and a major intensity in
212 *tbl* terminals.

213 To explore this possibility, we carried out an ultrastructural study in the LAL muscle
214 (Fig. 3). We found that the synaptic ultrastructure was apparently normal in most *tbl*
215 NMJs, i.e. vesicle-laden nerve terminals were abutted an enfolded, electron-dense
216 postsynaptic membrane zone were observed; synaptic vesicles were clustered at
217 active zones on the presynaptic membrane, and terminals were capped by
218 prolongations of Schwann cells. In contrast, some axon terminals of *tbl* neuromuscular
219 junction were separated from the junctional folds by thin prolongations of the Terminal
220 Schwann cells (TSCs), which were invading the synaptic cleft (Fig. 3D-E). The
221 Schwann cell interposition at the synaptic clef level could interfering with the pre- and
222 post-synaptic interconnection and, also, contribute to the neurotransmission delay
223 observed during the electrophysiology recordings.

224 **Axon wrapping and myelin sheath thickness are altered in *tbl* nerve terminals**

225 Next, we wondered if the myelin sheath was also altered in the nerve motor axons of
226 mutant mice. For that, we used an anti-myelin basic protein (MBP) antibody, and
227 labeled the pre-synaptic terminal with anti-SYP, and the post-synaptic receptors with
228 BTX (Fig. 4A). Confocal images in the LAL muscle showed that axons were positive for
229 myelin in both genotypes. However, while the ~11% of NMJs were stained by the anti-
230 MBP antibody in mutants, this was only observed in ~1% in controls (Control: $1.08 \pm$
231 0.24 %, (n, N = 13, 4); *tbl*: 11.43 ± 1.37 %, (n, N = 14, 4); P = 0.005) (Fig. 4B).

232 To better study this feature, we performed an ultrastructural study of the sciatic
233 nerve. Alterations in the paranodal axo–glial interactions were clearly observed in the
234 *tbl* sciatic nerve (Fig. 5). *Tbl* mice axons showed hypertrophic myelin infoldings that
235 compress the axon at the Ranvier node. In addition, myelin infoldings and thicker
236 myelin sheets with degenerative myelin signs inside the axons were observed. (Fig. 6).
237 The hypermyelination foci, whose growth protruded within the axon, compressed the
238 axon cytoplasm. The excess of myelin formed infoldings within the axons, which
239 appear in longitudinal sections as islands of degenerated myelin within the axon (Fig.
240 5J). All these alterations were accompanied with an increment in the amount of MBP
241 protein, as measured by western blot (Fig. 4C & D) (Control: 83.75 ± 18.74 %, (N = 6);
242 *tbl*: 214.04 ± 63.33 %, (N = 8); P = 0.04).

243 **Akt regulates axon wrapping and myelin sheath thickness alteration in *tbl* nerve** 244 **terminals**

245 It has been previously reported that HERC1 interacts with TSC2 (tuberous sclerosis
246 complex). TSC1-TSC2 complex is a negative regulator of mTORC1 (mammalian target
247 of rapamycin complex 1). Indeed, the mTORC1 function is upstream controlled by
248 PI3K/Akt³⁰. A role for Akt protein in axon wrapping and myelin sheath thickness has
249 been recently proposed³¹. Therefore, we checked whether the alterations in the
250 myelination of the *tbl* axons could be due to a dysregulation in Akt. To achieve this, we
251 analyzed the amount of phosphorylated Akt in sciatic nerve. We specifically found a

252 large increment in phosphorylated (Ser473) Akt2 which was more than seven fold in *tbl*
253 sciatic nerve in comparison with controls (Control: 32.96 ± 20.96 %, (N = 4); *tbl*: 239.36
254 ± 63.92 %, (N = 6); P = 0.01) (Fig. 7B). In contrast, no significant differences of
255 phosphorylated Akt1/3 proteins were found between groups (Control: 88.53 ± 28.11 %,
256 (N = 4); *tbl*: 70.15 ± 11.22 %, (N = 6); P = 0.29) (Fig. 7C).

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275 **Discussion**

276 We present compelling evidence that HERC1 E3 Ubiquitin Ligase fulfills an important
277 role in the peripheral motor nervous system by maintaining normal conduction of action
278 potential along the axon. The mutation of HERC1 in *tambaleante* mice provokes a
279 progressive prolongation of the latency of evoked release. We also show that there is a
280 miss-location of the Schwann cells at the neuromuscular junction consisting of
281 prolongations of these cells that invade the synaptic cleft. Besides, we found clear
282 indications of alterations in axon wrapping and myelin sheath thickness accompanied
283 by an increase of phosphorylated Akt in the *tbl* sciatic nerve.

284 Our previous results pointed out that the mutation in the HERC1 E3 Ubiquitin
285 Ligase (Gly483Glu substitution) present in the *tbl* mice alters neurotransmitter release
286 and contributes to the altered motor phenotype that appear before the cerebellar
287 affection takes place⁵. We now report that the evoked response is delayed due to
288 defects in non-myelinating and in myelinating Schwann cells in the PNS in these mice.
289 Similar increments in latency has been previously observed in other mouse models
290 with comparable neuromuscular pathology^{23, 32, 33}. Schwann cells, contribute to the
291 axonal and the pre-terminal efficient conduction of the axon potential (for review see
292³⁴). Perisynaptic or terminal Schwann cells (TSCs) cap the nerve terminal and play a
293 crucial role in maintaining its function^{35, 36}. Our results showed that there is a miss-
294 location of these glial cells appearing between pre- and post-synaptic terminal (Fig. 2A

295 & 3). This intrusion could be related to the alteration in axonal conduction because the
296 presynaptic and postsynaptic membranes need to be in close proximity to minimize the
297 delay in transmitting information across the synaptic cleft³⁷. The invasion of the
298 Schwann cells found in *tbl* NMJs is similar to that found in other mouse models with
299 neuromuscular dysfunction^{23, 37, 38, 39}. On the other hand, the myelinating Schwann
300 cells that wraps the axon are responsible for forming axo–glial interactions at the
301 paranodes and for electrically isolated axon^{40, 41}. The ultrastructural study in the sciatic
302 nerve from *tbl* mice revealed alterations in paranodal axo–glial interactions (Fig. 5),
303 hypertrophic myelin infoldings that compress the axon at the Ranvier nodes (Fig. 6)
304 and, hypermyelination foci, whose growth protrudes within the axon, compressing the
305 axon cytoplasm and forming infoldings (Fig. 6). Our findings phenocopy important
306 aspects of the PTEN conditional mice^{42, 43}, as well as transgenic mice expressing a
307 membrane-targeted, activated form of Akt under control of the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-
308 phosphodiesterase promoter³¹. In both cases, the PI3K pathway is implicated.
309 Previous *in vitro* studies demonstrated that PI3K activation is necessary for proper PNS
310 myelination^{44, 45}. Furthermore, these alterations in sciatic nerve were accompanied by
311 an increment in the expression of MBP, which is the principal protein component of the
312 myelin sheath. Similar results were found in mice models referenced above.

313 Altogether, these results led us to investigate the expression of Akt in *tbl* sciatic
314 nerve using WB approach. Our results show an increment of activated Akt-2, the active
315 form prevalent in Schwann cells³¹, that could trigger the myelin alteration observed in
316 *tbl* mice. However, the question that arises is how HERC1 mutation, which causes the
317 *tbl* phenotype, is related to Akt signaling. Previous studies describe that HERC1
318 interacts *in vitro* with TSC2³⁰, and prevents the formation of the complex TSC1-TSC2,
319 which inhibits mTOR function. Mashimo and collaborators, reported that *tbl* mice
320 showed a decrement of S6K1 phosphorylated protein, probably due to an impairment
321 of mTOR signaling in this mouse model¹. In addition, mTOR also controls the level of

322 autophagy and, consequently, an increment of autophagy function in *tbl* mutant mice
323 has been described ^{1, 46}. Therefore, we hypothesize that a compensatory mechanism
324 works throughout mTOR and S6K1 (Fig. 8) generating an increment of phosphorylated
325 Akt in Schwann cells of the sciatic nerve from *tbl* mutant mice. Alternatively, HERC1,
326 directly or throughout other intermediaries, could control the level of phosphorylated
327 Akt, but further experiments must be carried out to clarify this point.

328 Our results suggest that *tbl* could be a potential disease model for peripheral
329 neuropathies since the myelin abnormalities found in our model are histological
330 hallmarks of some Charcot-Marie-Tooth (CMT) forms ^{47, 48, 49, 50} and tomacular-
331 neuropathies ^{51, 52}. Indeed, CMT forms present slowly progressive weakness and
332 atrophy of the distal limb muscles ^{53, 54}, similar to that found in *tbl* mice ⁵. In addition,
333 our findings also point out the possible importance of HERC1 in the development of
334 other neurodegenerative diseases. In fact, recent studies have described HERC1
335 mutations in patients diagnosed of the Macrocephaly, Dysmorphic Facies, and
336 Psychomotor Retardation (MDFPMR) disorder (OMIM: # 617011) ^{55, 56, 57, 58}. One of the
337 characteristics of this disease is a severe alteration in motor development and
338 moderate–severe hypotonia ⁵⁷, thus mimicking that described in *tbl* mutant mice ⁵.
339 Thereby, alterations in genes whose products are directly or indirectly interacting with
340 HERC1 (Fig. 8), may share a similar peripheral neuropathic phenotype and are
341 candidates for future investigations.

342 In conclusion, we show here that HERC1 E3 Ubiquitin Ligase is involved in the
343 axon wrapping and myelin sheath thickness regulation probably throughout Akt in the
344 PNS. A molecular mechanism that might explain the implication of HERC1 in these
345 processes is proposed. In addition, our finding anticipate that *tambaleante* is a potential
346 model for the study of diseases involving peripheral neuropathies.

347

348

349

350

351

352 Author Contributions

353 Conceptualization, R. Ruiz and Angel M. Carrión; Methodology, R. Ruiz, S.B, J.A.A.,
354 L.T.; Investigation, R. Ruiz, S.B, M.A.R.C, I.G.D, E.M.P.V, M.A.P.C.; Writing – Original
355 Draft, R. Ruiz; Writing – Review & Editing, R. Ruiz, S.B, I.G.D, L.M.R, J.L.R, L.T.,
356 J.L.V, J.A.A and A.M.C ; Resources, J.L.R, L.T., J.L.V. ,J.A.A. and A.M.C; Funding
357 Acquisition, J.L.R, L.T., J.L.V. ,J.A.A. and A.M.C.; Supervision, R. Ruiz and A.M.C.

358

359 Acknowledgements

360 This work was supported by grants to: AMC and RR from the Fundación Ramón
361 Areces – Spain and DGICYT – Spain (Departamento Gubernamental de
362 Investigaciones Científicas y Tecnológicas: BFU2011-27207); RR (Juan de la Cierva
363 contract JCI-2011-08888 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)
364 and VPPI-US from the University of Seville); JLV and RRL (MINECO: SAF2015-64171-
365 R); JAA (Spanish Junta de Andalucía BIO-122 and DGICYT BFU2015-64536-R) and,
366 SB were supported by the Fundación Ramón Areces fellowships. We are grateful to
367 Juan Luis Ribas, Cristina Vaquero and Asunción Fernández for their helpful technical
368 supports (CITIUS, University of Seville).

369

370

371

372

373

374 Bibliography

- 375 1. Mashimo T, *et al.* Progressive Purkinje cell degeneration in tambaleante mutant mice
376 is a consequence of a missense mutation in HERC1 E3 ubiquitin ligase. *PLoS Genet* **5**,
377 e1000784 (2009).
378
- 379 2. Rossi F, Jankovski A, Sotelo C. Target neuron controls the integrity of afferent axon
380 phenotype: a study on the Purkinje cell-climbing fiber system in cerebellar mutant
381 mice. *J Neurosci* **15**, 2040-2056 (1995).
382
- 383 3. Wassef M, Sotelo C, Cholley B, Brehier A, Thomasset M. Cerebellar mutations affecting
384 the postnatal survival of Purkinje cells in the mouse disclose a longitudinal pattern of
385 differentially sensitive cells. *Dev Biol* **124**, 379-389 (1987).
386
- 387 4. Porrás-García ME, Ruiz R, Pérez-Villegas EM, Armengol JA. Motor learning of mice
388 lacking cerebellar Purkinje cells. *Front Neuroanat* **7**, 4 (2013).
389
- 390 5. Bachiller S, *et al.* The HERC1 E3 Ubiquitin Ligase is essential for normal development
391 and for neurotransmission at the mouse neuromuscular junction. *Cell Mol Life Sci* **72**,
392 2961-2971 (2015).
393
- 394 6. Hegde AN, Upadhyaya SC. The ubiquitin-proteasome pathway in health and disease of
395 the nervous system. *Trends Neurosci* **30**, 587-595 (2007).
396
- 397 7. van Tijn P, Hol EM, van Leeuwen FW, Fischer DF. The neuronal ubiquitin-proteasome
398 system: murine models and their neurological phenotype. *Prog Neurobiol* **85**, 176-193
399 (2008).
400
- 401 8. Sanchez-Tena S, Cubillos-Rojas M, Schneider T, Rosa JL. Functional and pathological
402 relevance of HERC family proteins: a decade later. *Cell Mol Life Sci* **73**, 1955-1968
403 (2016).
404
- 405 9. Deng HX, *et al.* Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset
406 ALS and ALS/dementia. *Nature* **477**, 211-215 (2011).
407
- 408 10. Dlamini N, *et al.* Clinical and neuropathological features of X-linked spinal muscular
409 atrophy (SMAX2) associated with a novel mutation in the UBA1 gene. *Neuromuscul*
410 *Disord* **23**, 391-398 (2013).
411

- 412 11. Ramser J, *et al.* Rare missense and synonymous variants in UBE1 are associated with X-
413 linked infantile spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* **82**, 188-193 (2008).
414
- 415 12. Rusmini P, *et al.* Aggregation and proteasome: the case of elongated polyglutamine
416 aggregation in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurobiol Aging* **28**, 1099-1111
417 (2007).
418
- 419 13. Aghamaleky Sarvestany A, *et al.* Label-free quantitative proteomic profiling identifies
420 disruption of ubiquitin homeostasis as a key driver of Schwann cell defects in spinal
421 muscular atrophy. *J Proteome Res* **13**, 4546-4557 (2014).
422
- 423 14. Bogdanik LP, *et al.* Loss of the E3 ubiquitin ligase LRSAM1 sensitizes peripheral axons
424 to degeneration in a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Dis Model Mech* **6**,
425 780-792 (2013).
426
- 427 15. Saifi GM, *et al.* SIMPLE mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential
428 role of its protein product in protein degradation. *Hum Mutat* **25**, 372-383 (2005).
429
- 430 16. Ylikallio E, *et al.* Deficiency of the E3 ubiquitin ligase TRIM2 in early-onset axonal
431 neuropathy. *Hum Mol Genet* **22**, 2975-2983 (2013).
432
- 433 17. Lobsiger CS, Cleveland DW. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous
434 neurodegenerative disease. *Nat Neurosci* **10**, 1355-1360 (2007).
435
- 436 18. Hunter G, Aghamaleky Sarvestany A, Roche SL, Symes RC, Gillingwater TH. SMN-
437 dependent intrinsic defects in Schwann cells in mouse models of spinal muscular
438 atrophy. *Hum Mol Genet* **23**, 2235-2250 (2014).
439
- 440 19. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in
441 neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* **187**, 761-772 (2009).
442
- 443 20. Hunter G, *et al.* Restoration of SMN in Schwann cells reverses myelination defects and
444 improves neuromuscular function in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, (2016).
445
- 446 21. Ruiz R, Casanas JJ, Torres-Benito L, Cano R, Tabares L. Altered intracellular Ca²⁺
447 homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* **30**,
448 849-857 (2010).
449
- 450 22. Ruiz R, Biea IA, Tabares L. alpha-Synuclein A30P decreases neurodegeneration and
451 increases synaptic vesicle release probability in CSPalpha-null mice. *Neuropharmacology* **76 Pt A**, 106-117 (2014).
452
453
- 454 23. Ruiz R, Casanas JJ, Sudhof TC, Tabares L. Cysteine string protein-alpha is essential for
455 the high calcium sensitivity of exocytosis in a vertebrate synapse. *Eur J Neurosci* **27**,
456 3118-3131 (2008).
457
- 458 24. Ruiz R, Tabares L. Neurotransmitter release in motor nerve terminals of a mouse
459 model of mild spinal muscular atrophy. *J Anat* **224**, 74-84 (2014).
460
- 461 25. Ruiz R, Cano R, Casanas JJ, Gaffield MA, Betz WJ, Tabares L. Active zones and the
462 readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the
463 mouse. *J Neurosci* **31**, 2000-2008 (2011).

464
465 26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
466 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**,
467 248-254 (1976).
468
469 27. Arnold AS, *et al.* Morphological and functional remodelling of the neuromuscular
470 junction by skeletal muscle PGC-1alpha. *Nat Commun* **5**, 3569 (2014).
471
472 28. Datyner NB, Gage PW. Phasic secretion of acetylcholine at a mammalian
473 neuromuscular junction. *J Physiol* **303**, 299-314 (1980).
474
475 29. Sabatini BL, Regehr WG. Timing of neurotransmission at fast synapses in the
476 mammalian brain. *Nature* **384**, 170-172 (1996).
477
478 30. Chong-Kopera H, *et al.* TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2
479 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **281**, 8313-8316 (2006).
480
481 31. Domenech-Estevez E, *et al.* Akt Regulates Axon Wrapping and Myelin Sheath Thickness
482 in the PNS. *J Neurosci* **36**, 4506-4521 (2016).
483
484 32. Angaut-Petit D, McArdle JJ, Mallart A, Bournaud R, Pincon-Raymond M, Rieger F.
485 Electrophysiological and morphological studies of a motor nerve in 'motor endplate
486 disease' of the mouse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **215**, 117-125 (1982).
487
488 33. Edwards JP, Lee CC, Duchen LW. The evolution of an experimental distal motor
489 axonopathy. Physiological studies of changes in neuromuscular transmission caused by
490 cycloleucine, an inhibitor of methionine adenosyltransferase. *Brain* **117 (Pt 5)**, 959-
491 974 (1994).
492
493 34. Feng Z, Koirala S, Ko CP. Synapse-glia interactions at the vertebrate neuromuscular
494 junction. *Neuroscientist* **11**, 503-513 (2005).
495
496 35. Ko CP, Robitaille R. Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse:
497 Adaptable, Multitasking Glial Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020503 (2015).
498
499 36. Reddy LV, Koirala S, Sugiura Y, Herrera AA, Ko CP. Glial cells maintain synaptic
500 structure and function and promote development of the neuromuscular junction in
501 vivo. *Neuron* **40**, 563-580 (2003).
502
503 37. Patton BL, Chiu AY, Sanes JR. Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic
504 cleft. *Nature* **393**, 698-701 (1998).
505
506 38. Fernandez-Chacon R, *et al.* The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic
507 degeneration. *Neuron* **42**, 237-251 (2004).
508
509 39. Voigt T, Meyer K, Baum O, Schumperli D. Ultrastructural changes in diaphragm
510 neuromuscular junctions in a severe mouse model for Spinal Muscular Atrophy and
511 their prevention by bifunctional U7 snRNA correcting SMN2 splicing. *Neuromuscul*
512 *Disord* **20**, 744-752 (2010).
513

- 514 40. Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen KR. Novel
515 signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and
516 dedifferentiation. *J Peripher Nerv Syst* **13**, 122-135 (2008).
517
- 518 41. Herbert AL, Monk KR. Advances in myelinating glial cell development. *Curr Opin*
519 *Neurobiol* **42**, 53-60 (2017).
520
- 521 42. Goebbels S, *et al.* Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in glia triggers cell-
522 autonomous membrane wrapping and myelination. *J Neurosci* **30**, 8953-8964 (2010).
523
- 524 43. Goebbels S, *et al.* Genetic disruption of Pten in a novel mouse model of tomaculous
525 neuropathy. *EMBO Mol Med* **4**, 486-499 (2012).
526
- 527 44. Maurel P, Salzer JL. Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and
528 the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity. *J Neurosci* **20**, 4635-4645
529 (2000).
530
- 531 45. Ogata T, *et al.* Opposing extracellular signal-regulated kinase and Akt pathways control
532 Schwann cell myelination. *J Neurosci* **24**, 6724-6732 (2004).
533
- 534 46. Ruiz R, Perez-Villegas EM, Bachiller S, Rosa JL, Armengol JA. HERC 1 Ubiquitin Ligase
535 Mutation Affects Neocortical, CA3 Hippocampal and Spinal Cord Projection Neurons:
536 An Ultrastructural Study. *Front Neuroanat* **10**, 42 (2016).
537
- 538 47. Bolis A, *et al.* Loss of Mtmr2 phosphatase in Schwann cells but not in motor neurons
539 causes Charcot-Marie-Tooth type 4B1 neuropathy with myelin outfoldings. *J Neurosci*
540 **25**, 8567-8577 (2005).
541
- 542 48. Tersar K, *et al.* Mtmr13/Sbf2-deficient mice: an animal model for CMT4B2. *Hum Mol*
543 *Genet* **16**, 2991-3001 (2007).
544
- 545 49. Golan N, *et al.* Genetic deletion of Cadm4 results in myelin abnormalities resembling
546 Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Neurosci* **33**, 10950-10961 (2013).
547
- 548 50. Lee SM, *et al.* Motor and sensory neuropathy due to myelin infolding and paranodal
549 damage in a transgenic mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1C. *Hum*
550 *Mol Genet* **22**, 1755-1770 (2013).
551
- 552 51. Adlkofer K, Frei R, Neuberg DH, Zielasek J, Toyka KV, Suter U. Heterozygous peripheral
553 myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating
554 tomaculous neuropathy. *J Neurosci* **17**, 4662-4671 (1997).
555
- 556 52. Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U. Hypermyelination and
557 demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nat Genet* **11**, 274-280
558 (1995).
559
- 560 53. Murakami T, Garcia CA, Reiter LT, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease and related
561 inherited neuropathies. *Medicine (Baltimore)* **75**, 233-250 (1996).
562
- 563 54. Pareyson D. Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: molecular basis
564 for distinction and diagnosis. *Muscle Nerve* **22**, 1498-1509 (1999).
565

- 566 55. Aggarwal S, Bhowmik AD, Ramprasad VL, Murugan S, Dalal A. A splice site mutation in
567 HERC1 leads to syndromic intellectual disability with macrocephaly and facial
568 dysmorphism: Further delineation of the phenotypic spectrum. *Am J Med Genet A* **170**,
569 1868-1873 (2016).
570
- 571 56. Nguyen LS, *et al.* A nonsense variant in HERC1 is associated with intellectual disability,
572 megalencephaly, thick corpus callosum and cerebellar atrophy. *Eur J Hum Genet* **24**,
573 455-458 (2016).
574
- 575 57. Ortega-Recalde O, *et al.* Biallelic HERC1 mutations in a syndromic form of overgrowth
576 and intellectual disability. *Clin Genet* **88**, e1-3 (2015).
577
- 578 58. Utine GE, *et al.* HERC1 mutations in idiopathic intellectual disability. *Eur J Med Genet*,
579 (2017).
580

581
582
583
584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

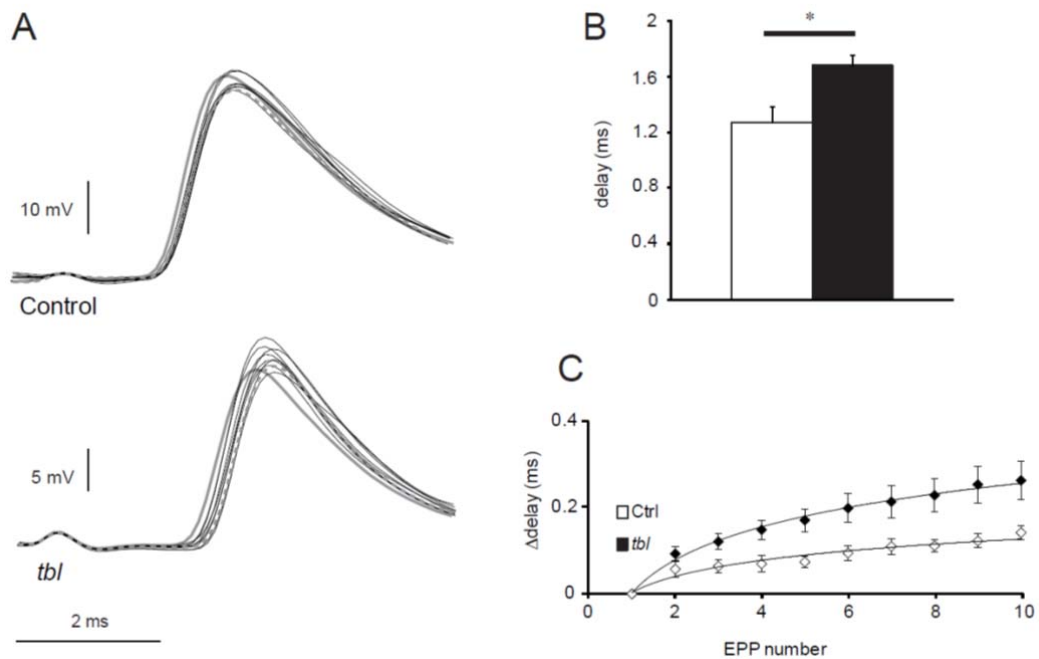
596

597

598

599

600 Figure & Fig. Legend



601

602 Fig. 1: *Tambaleante* mutant mice demonstrate a progressive increment in synaptic

603 delay. (A) Representative recordings of control (upper traces) and *tbl* (lower traces)

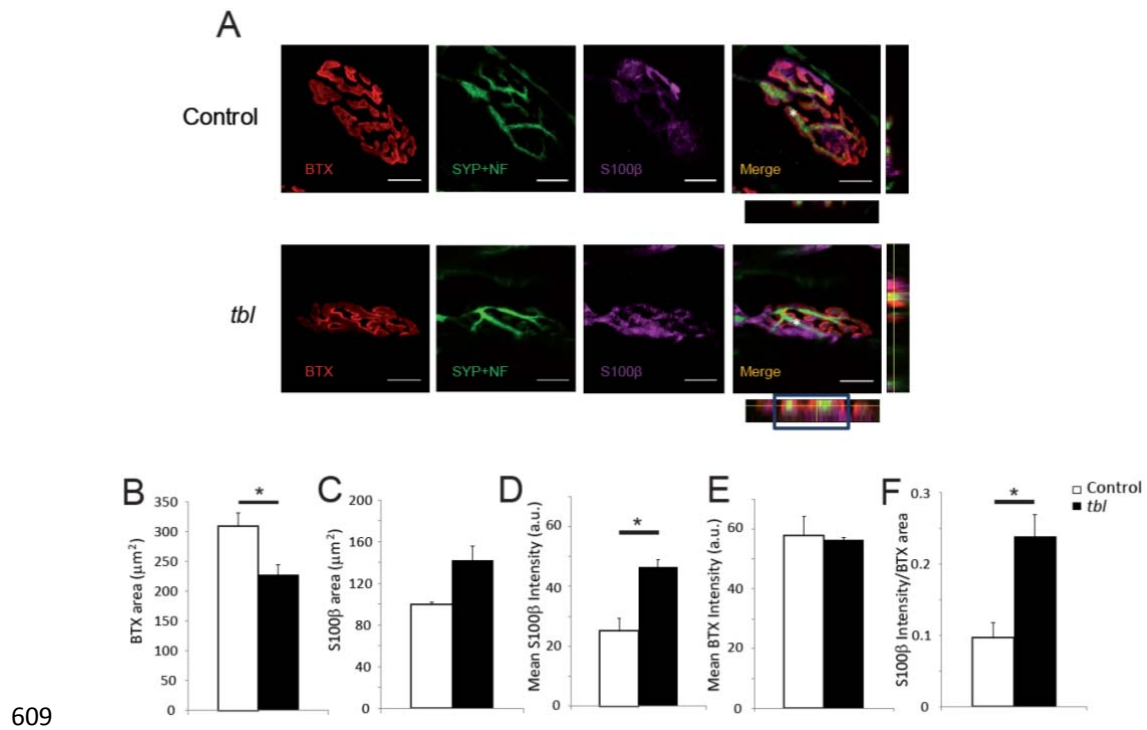
604 EPPs during a 10-stimuli train at 100 Hz. The continuous grey line represents the first

605 EPP in the train and the discontinuous line the last response. (B) Measured of the

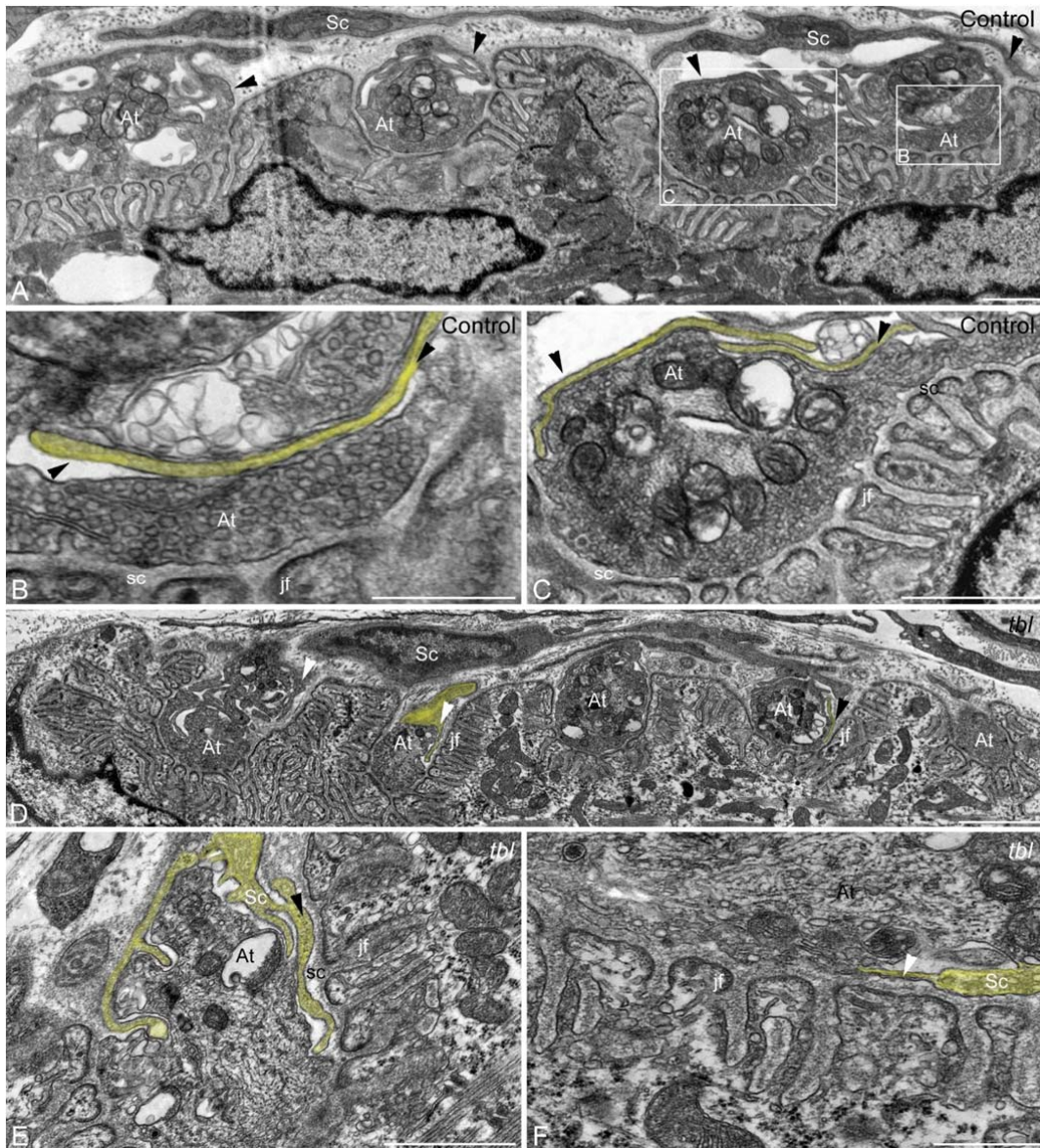
606 mean delay from the first peak of the stimulation artifact to the initial 10% of the first

607 evoked response in *tbl* and control. (C) Average delay increment as a function of the

608 successive stimuli in *tbl* and control. *P < 0.05.

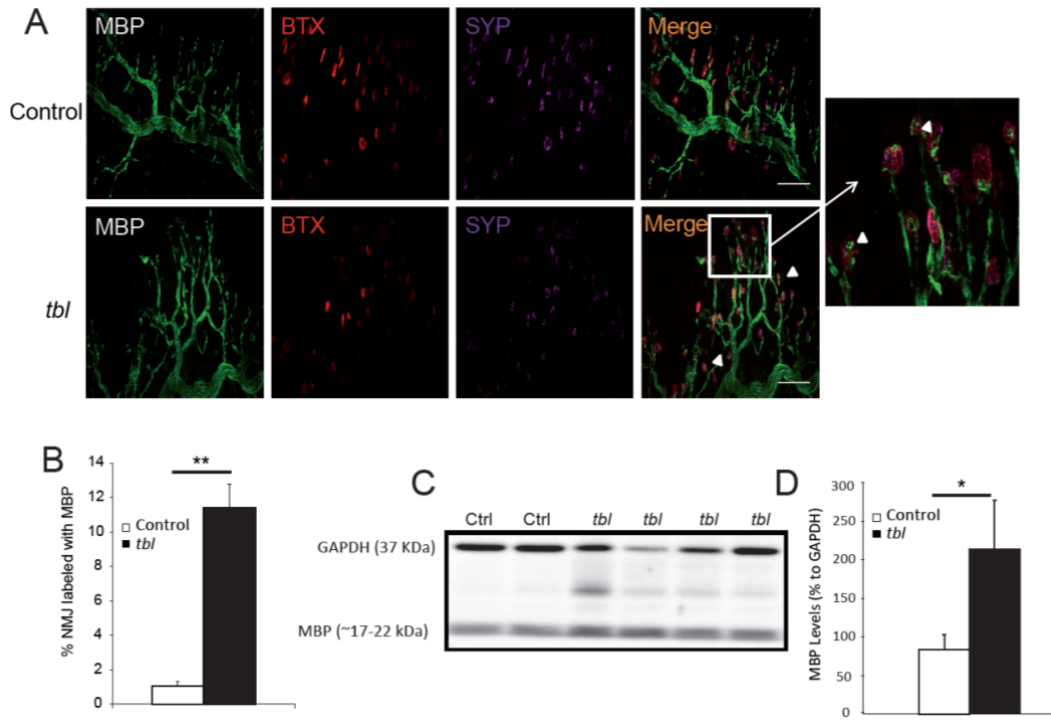


610 Fig. 2: S100β location and mean intensity is altered in *tbl* mice. (A) Representative *en*
611 *face* views of NMJs from the LAL muscle stained with BTX-Rho (red), anti-S100β
612 (magenta) and anti-NF+SYP (green). Images are Z-stack projections and the scale bar
613 10 μm. Orthogonal view in control and mutant left and down for each merge images.
614 (B) The mean postsynaptic areas were significantly smaller in mutants than in control
615 terminals. (C) No difference was found in the mean S100β area between groups. (D)
616 The mean S100β intensity was higher in *tbl* terminals in comparison with control, but no
617 difference was found in BTX intensity (E). The normalized mean intensity vs BTX area
618 is increased in *tbl* terminals in comparison with the controls. *P < 0.05.



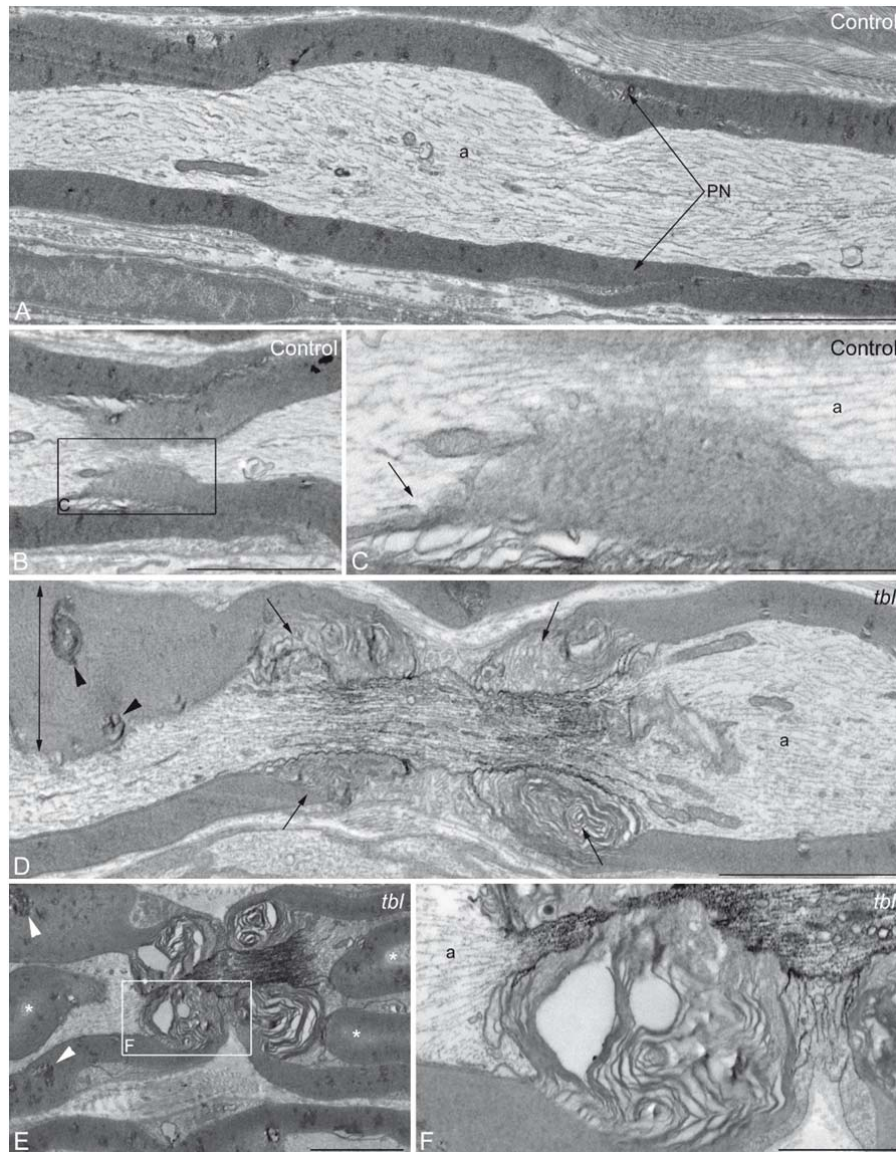
619

620 Fig. 3: Electron microphotographs of the motor end-plate of *levator auris longus* muscle
 621 of control and *tambaleante* (*tbl*) mice. In control mice, Schwann cells prolongations (A-
 622 C, arrowheads, yellow) cover the axon terminals (A-C, At) that appose directly to the
 623 sarcolemma junctional folds face (B-C, jf) separated through the synaptic cleft (B-C,
 624 sc). In contrast, some axon terminals (D-F, At) of *tbl* neuromuscular junction are
 625 separated from the junctional folds (D-F, jf) by thin prolongations of Schwann cells (D-
 626 F, arrowheads, yellow) that invade the synaptic cleft (E-F, sc). Sc, Schwann cell. Bars
 627 = 2 μm (A, D), 1 μm (C, D-E), 0.5 μm (B).



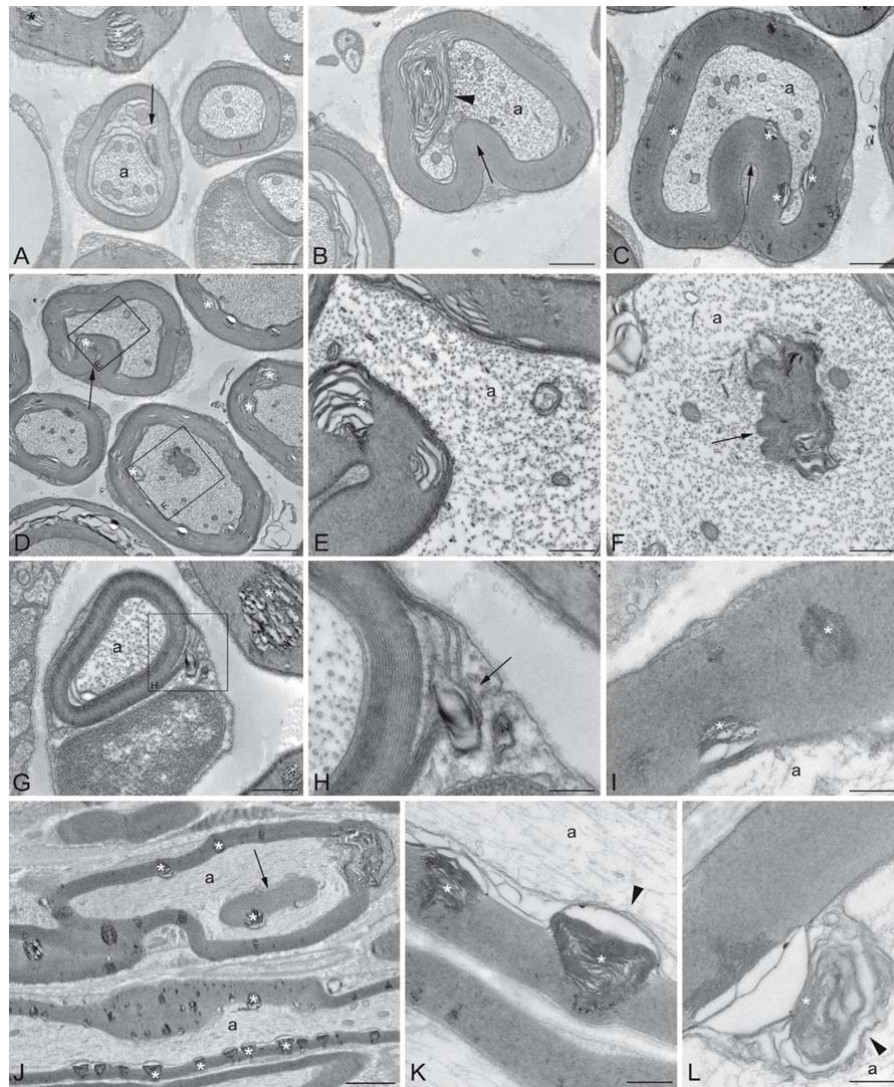
628

629 Fig. 4: The MBP distribution is altered in *tbl* NMJ. (A) Representative *en face* views of
 630 NMJs from the LAL muscle stained with anti-MBP (green), BTX-Rho (red) and anti-
 631 SYP (magenta). Images are Z-stack projections and the scale bar 100 μ m. (B)
 632 Quantitative analysis showed (white head-arrows in A) an anomalous distribution of
 633 MBP in *tbl* mutant mice at NMJs junctions' level in comparison with control ones. (C)
 634 Representative western blot for MBP and GAPDH in sciatic nerve proteins from control
 635 and *tbl* mice. (D) Results of MBP quantification in sciatic nerve. The results are
 636 expressed as % of intensity relative to GAPDH bands. N = 6 control and N = 8 *tbl*. *P <
 637 0.05; ** P < 0.005.



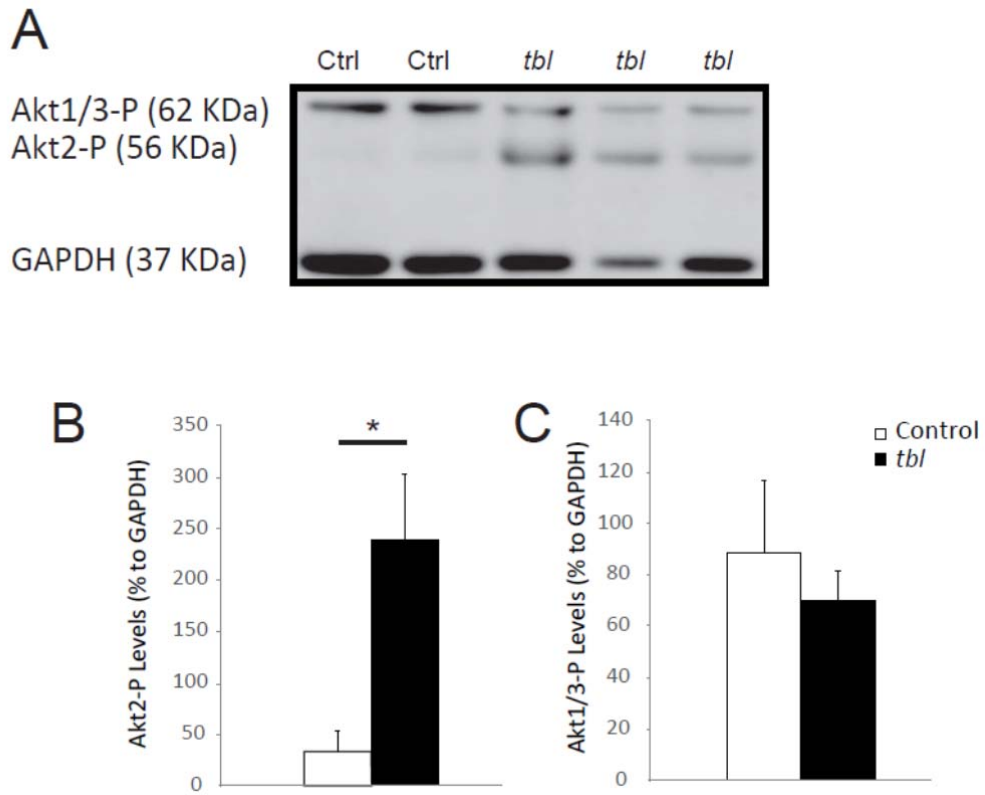
638

639 Fig. 5: Electron microphotographs of longitudinal sections through the sciatic nerve of
 640 control and *tambaleante* (*tbl*) mice. Contrary to the regular successive lamellae that
 641 forms the myelin of the nodal region in control mice (A-C, arrows), *tbl* axons show
 642 hypertrophic myelin infoldings (D, arrows) that compress the axon at the Ranvier node.
 643 This compression of the axoplasm and microtubules gives it an abnormal
 644 electron density (E-F). In addition, anomalous hypertrophic myelin infoldings (E,
 645 asterisks) and thicker myelin sheet (D, double arrow) with degenerative myelin signs
 646 inside (D, E, arrowheads) were observed. a, axon . PN, Ranvier's paranodal region.
 647 Scale bars: 3 μm (A, D), 2 μm (B, E), 0.5 μm (C, F).



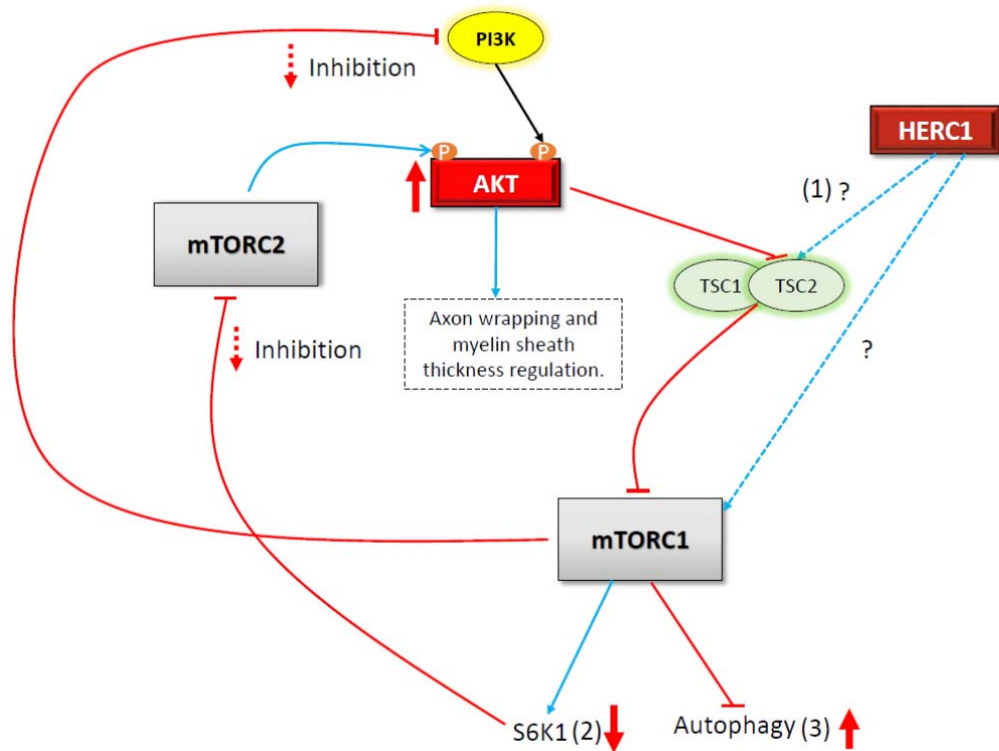
648

649 Fig. 6: Electron microphotographs of transverse sections through the *tbl* sciatic nerve.
 650 Thicker myelin sheaths show aberrant signs of myelination consisting in
 651 hypermyelination foci (A-L, asterisks), whose growth protrudes within the axon (B-D, J-
 652 L, arrowheads) and compress the axon cytoplasm (a). The excess of myelin forms
 653 infoldings within the axons (B, C, J), which appear in longitudinal sections as islands of
 654 degenerating myelin within the axon (F, J, arrows). Medium size myelinated axons
 655 seems to be less affected (A, G); however, alterations of the outer (H, arrow) and inner
 656 mesaxon (A, arrow) are frequently detected. a, axon. Scale bars: 2 μm (D, J), 1 μm
 657 (A_C, G), 0.5 μm (E, F; I, K, L), 0.2 μm (H).



658

659 Fig. 7: Akt-2 phosphorylated is increased in *tbl* sciatic nerve. (A) Proteins from the
 660 sciatic nerve were separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose
 661 membranes, and stained using the specific antibodies indicated. (B) Results are
 662 expressed as percentage of intensity relative to GAPDH bands. * $P < 0.05$, $N = 4$
 663 control and $N = 6$ *tbl*.



664

665 Fig. 8: The schema shows a possible pathway where HERC1 might lead to regulate
 666 Akt levels. HERC1 interact *in vitro* with TSC (tuberous sclerosis complex) 2³⁰ (1), and
 667 prevent the complex TSC1-TSC2 formation which inhibits mTOR function.
 668 Consequently, in *tbl* mice is observed a decrement in the amount of S6K1
 669 phosphorylated protein as well as an increment of autophagy function, both of them
 670 regulated by mTOR¹ (2).^{1, 46} (3). Therefore, we hypothesize that there are a
 671 compensatory mechanism throughout mTOR and S6K1 that generate an increment of
 672 phosphorylated Akt in Schwann cells of the sciatic nerve in *tbl* mutant mice responsible
 673 for this phenotype.

674

675

676

677

678