

Ph.D. Thesis

Programa de Doctorado: Neurociencia y sus Aplicaciones Clínicas

**A mechanism of RGS14₄₁₄-mediated recovery of
an episodic memory loss: implication of GluR2
subunit of AMPA receptor**

Mariam Al-Masmudi Martín
Lab. Neurobiología, CIMES, UMA


Thesis supervisor: Dr. Zafaruddin Khan

Málaga, 2015



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Mariam Al-Masmudi Martín

 <https://orcid.org/0000-0001-5005-9199>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA

Ph.D. Thesis

Programa de Doctorado: *Neurociencia y sus Aplicaciones Clínicas*

A mechanism of RGS14₄₁₄-mediated recovery of an episodic memory loss: implication of GluR2 subunit of AMPA receptor

Mariam Al-Masmudi Martín
Lab. Neurobiología, CIMES, UMA

Thesis supervisor: Dr. Zafaruddin Khan

Málaga, 2015



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dr. Zafaruddin Khan, Director del laboratorio de Neurobiología de Centro de Investigaciones Médico Sanitarias y Profesor del departamento de Medicina y Dermatología de la facultad de Medicina de la Universidad de Málaga,

INFORMA

Que Doña Mariam Al-Masmudi Martín, Licenciada en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada “A mechanism of RGS14₄₁₄-mediated recovery of an episodic memory loss: implication of GluR2 subunit of AMPA receptor”. Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, se autoriza su presentación para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente documento en Málaga, a 30 de septiembre de 2015.

Fdo.: Zafaruddin Khan

Agradecimientos

Después de más de 5 años de trabajo y dedicación a la realización de esta tesis doctoral, llega el momento de echar la mirada hacia atrás para recordar y agradecer a cada una de las personas a las que he tenido la suerte de conocer durante estos años y que han hecho posible, de una manera u otra, haber logrado culminar esta importante etapa de mi vida.

Por ello he de dar las gracias...

A mi director de tesis el Dr. Zafaruddin Khan por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por depositar en mí su confianza así como por el apoyo y ayuda brindados a la hora del desarrollo de este trabajo de tesis.

A los distintos grupos de investigación con los que hemos tenido la oportunidad de colaborar. Al grupo del Dr. Zafar Bashir, del departamento de fisiología y farmacología de la Universidad de Bristol, en especial a los Doctores Paul y Francesco por poner a mi disposición todo aquello que necesité para mi formación durante mi estancia de 7 meses en Reino Unido, por su amabilidad y por estar siempre dispuestos a ayudar. Gracias a vosotros pude sumergirme en el mundo de la electrofisiología y obtener parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis. Al Dr. David Fernández de Sevilla, del departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, por todo el conocimiento aportado en cuanto a técnicas de electrofisiología e imagen de calcio que han sido de gran ayuda a la hora de interpretar algunos de los datos que aparecen en esta tesis, en especial a los componentes de su grupo, José y Laura por haberme acogido en su laboratorio con los brazos abiertos y haberme hecho sentir como una más del grupo durante mi estancia en Madrid. Al grupo del Dr. Robert Nisticó por cedermé parte de los datos de electrofisiología referentes a los experimentos de despotenciación, los cuales forman parte de este manuscrito.

A los distintos grupos de investigación con los que he tenido la oportunidad de aprender y enriquecerme profesionalmente. A la Dra. Antonia Gutiérrez y a su grupo; Eli, Laura, Raquel, Mercedes y Vanesa entre otros, por haberme aportado parte de los conocimientos que he adquirido en las técnicas de histología y por estar siempre dispuestas a ayudar en todo momento. Al la Dra. Alicia Rivera y a su grupo; por cedernos parte del material de estereotaxia, en especial a Alejandra por todos los consejos aportados sobre la técnica de Western Blot. Al grupo del Dr. Javier Márquez, en especial a Carolina Cardona por su tiempo dedicado a enseñarme el revelado con ECL. Al grupo del Laboratorios de lípidos, a José Rijo y María José por haber estado siempre dispuestos a cedernos amablemente sus equipos.

A Irene, Juan y Gloria, "Mi chupipandí". A Irene, mi "irenilla", porque sin tu apoyo no hubiese conseguido llegar hasta aquí, porque siempre he podido contar contigo desde el primer momento que empezamos juntas esta aventura, porque has estado siempre dispuesta ayudarme y enseñarme sin esperar nada a cambio, aunque eso significara quedarte hasta muy tarde en el laboratorio o incluso venir un fin de semana o un festivo desde Álora. Sólo por haber tenido la oportunidad de conocerte ha merecido la pena haber iniciado este proyecto, porque en ti no solo encontré a la mejor de las compañeras y maestras sino también a mi mejor amiga. Espero seguir disfrutando de tu compañía y la de Pedro por mucho tiempo. A Juan, mi "pareja artística" por haber sido un pilar muy importante en esta etapa, porque gran parte de lo que sé lo aprendí gracias a ti (Cultivos celulares, Inmunohistoquímica, Biología molecular...), porque

siempre has estado dispuesto a ayudarme y a guiarme en este largo camino incluso desde la distancia. Gracias a ti he podido crecer como investigadora y potenciar en mí ese instinto curioso que te caracteriza. Te debo mucho Juan, te estaré eternamente agradecida. A Gloria, nuestra “mami” en el laboratorio, por haber estado pendiente siempre tanto de Irene como de mí, porque con tu llegada al laboratorio llego un aire de frescura y ternura. Gracias por todos los consejos y los ánimos brindados.

A mis antiguos compañeros de laboratorio. A Manuel, por haberme ayudado en los inicios de mi carrera investigadora, haberme aportado parte de mis conocimientos en las técnicas de comportamiento y haber participado en los estudios de envejecimiento. A Sinforiano por su tiempo dedicado a enseñarme la técnica de qRT-PCR. A Eduardo por sus enseñanzas y consejos en el ámbito de la neuropsicobiología, todavía recuerdo aquellas largas horas realizando los experimentos conductuales de tacto y ese humor sarcástico tan particular en ti.

A Elisa por ayudarme, guiarme y aconsejarme en todo momento a la hora de redactar la presente memoria de tesis doctoral y preparar la presentación con esa rigurosidad que te caracteriza.

A las nuevas incorporaciones del laboratorio; Inma, María Elena, Lucía, María, Marta, Carlos y José, porque han hecho que esta última fase de escritura de la tesis haya sido mucho más llevadera y menos tediosa. Gracias por los buenos momentos y por todo vuestro apoyo.

A María Jesús, “el miembro no oficial del grupo”, porque sin ti las largas horas en el estabulario no hubiesen sido lo mismo. Gracias por tu amistad. Espero poder seguir formando parte de tu vida y tú de la mía por mucho tiempo.

Al personal del Estabulario, a Ricardo por siempre estar dispuesto a ayudarme y aportarme todos sus conocimientos en lo que se refiere al cuidado y manejo de animales de experimentación, a Ana, Eva, Conchi, Marivi, Vanesa, Isa, Sole y en especial a mi Soraya por su amabilidad, su colaboración y sus ánimos. Al personal del servicio de Biología celular y cultivos celulares del SCAI, en especial a Reme y Casimiro por toda la ayuda prestada a la hora de desarrollar mis experimentos.

A Zouhir, por haber estado allí en todo momento, en los buenos y en los malos, apoyándome y animándome a seguir adelante, a no tirar nunca la toalla y recordándome siempre que era capaz de conseguir mis metas y sueños. Sin ti no hubiese podido llegar hasta aquí. Gracias por ser como eres y que sepas que parte de esta tesis va dedicada a ti.

A todo el personal del CIMES, mi segunda casa, a Miguel, María Jesús, Raquel, Antonio, Jaime, José, Cárdenas, Guerra, Ricardo, Ana, Gema...por haber hecho más amena tantas horas de trabajo y haberme hecho sentir, valga la redundancia, “como en casa”, en especial a Gema por estar siempre pendiente y preocuparse tanto de Irene como de mí y por tantas tardes de risas.

Y finalmente y no por ello menos importante, a mi familia, a mis padres y mis hermanitos porque aunque nunca llegaron a comprender del todo mi trabajo y mi dedicación a la investigación con sus correspondientes largas jornadas de trabajo sacrificando muchos fines de semana y días de vacaciones, siempre estuvieron allí apoyándome en todo momento desde la distancia y alegrándose de cada meta lograda por pequeña que fuera en este largo camino. Espero haber estado a la altura y haberos hecho sentir orgullosos. Esta tesis va dedicada a vosotros.

*A mis padres y a
mis hermanos*

“Those who cannot remember the
past are condemned to repeat it.”

George Santayana

ENGLISH VERSION..... 1

VERSIÓN EN ESPAÑOL 137

English version

Abbreviations

ACSF: artificial cerebrospinal fluid.

AD: Alzheimer's disease.

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor.

ANOVA: Analysis of variance.

AP: anteroposterior.

BSA: bovine serum albumin.

CamKII: Ca^{2+} / calmodulin - dependent protein kinase II.

CCh: carbachol.

cDNA: complementary DNA.

CFU: colony-forming unit.

CNQX: 6-cyano-7-nitroquinolaxaline-2,3-dione.

CREB: cAMP response element-binding protein.

Ct: threshold cycle.

DABCO: 1,4-Diazabicyclo[2.2.2] octane.

DI: discrimination index.

DL-AP5: DL - 2 - Amino - 5 - phosphonopentanoic acid.

DNA: deoxyribonucleic acid.

DV: dorsoventral.

ERK: extracellular signal-regulated kinase.

fEPSP: field excitatory postsynaptic potential.

Fr: frontal cortex.

GAP: GTPase-activating protein.

GDP: guanosine diphosphate.

GluR1-4: ionotropic glutamate receptors (AMPA).

GPCR: G protein-coupled receptor.

GPR domain: G protein regulatory domain.

GTP: guanosine triphosphate.

HFS: high-frequency stimulation.

JNK: c-Jun N-terminal kinase.

KN62: 4-[(2S)-2- [(5-isoquinolinyl-sulfonyl) methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperazinyl) propyl] phenyl isoquinolinesulfonic acid ester.

LFS: low-frequency stimulation.

LTD: long-term depression.

LTP: long-term potentiation.

LY367385: (S)-(+)- α -Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid.

mAChR: muscarinic cholinergic receptor.

mACSF: modified artificial cerebrospinal fluid.

MAPKK (MKK): mitogen-activated protein kinase kinase.

MCS: multiple-cloning site.

mGluR: metabotropic glutamate receptor.

ML: mediolateral.

mRNA: messenger RNA.

MTL: medial temporal lobe.

NMDAR: N-methyl-D-aspartate receptor.

OD: optical density.

ORM: object recognition memory.

PARP-1: poly[ADP]-ribose polymerase 1.

PBS: phosphate buffered saline.

PCR: polymerase chain reaction.

PKA: cAMP-dependent protein kinase.

PKC: calcium-dependent protein kinase.

PKM ζ : protein kinase M ζ .

PLP: Periodate-lysine-paraformaldehyde.

PRh: perirhinal cortex.

qRT-PCR: quantitative reverse transcription PCR.

RBD domain: Ras binding domain.

RGS: regulator of G protein signaling.

RNA: ribonucleic acid.

Rpl19: ribosomal protein L19.

TIQ-A: thieno[2,3-c]isoquinolin-5(4H)-one.

U0126: 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(o-aminophenylmercapto) butadiene.

VDCC: voltage-dependent calcium channel.

ZIP: z-Pseudosubstrate inhibitory peptide.

Table of contents

I. INTRODUCTION.....	9
1 Regulator of G protein signaling 14 (RGS14).....	11
2 RGS14₄₁₄, a spliced variant of RGS14.....	13
2.1 Object recognition memory and RGS14 ₄₁₄	14
2.1.1 Object recognition memory (ORM).....	14
2.1.2 Role of RGS14 ₄₁₄ in the ORM	14
3 Implication of perirhinal Hebbian synaptic plasticity in recognition memory	15
3.1 The perirhinal projections	15
3.2 Hebbian synaptic plasticity in perirhinal cortex	15
3.3 LTP/LTD in recognition memory	16
4 Memory loss in Alzheimer´s disease and aging	16
4.1 Aging.....	17
4.2 Alzheimer´s disease	17
5 Mechanism of memory enhancement.....	18
II. OBJECTIVES.....	23
III. MATERIALS AND METHODS.....	27
1 First block of experiments: Explore the effect of RGS14₄₁₄ gene treatment in recovery of an episodic memory loss	29
1.1 Experimental design.....	29
1.1.1 Effect of RGS14 in aging.....	29
1.1.2 Effect of RGS14 in transgenic mice with Alzheimer´s disease	30
1.2 Methods.....	30
1.2.1 Preparation of lentivirus.....	30
1.2.2 Animal housing conditions and stereotaxic surgery	43
1.2.3 Confirmation of RGS14 ₄₁₄ protein expression by immunohistochemistry.....	45
1.2.4 ORM test.....	46
2 Second block of experiments: Identify pathways implicated in RGS14₄₁₄-mediated memory enhancement	48
2.1 Experimental design.....	48
2.2 Methods.....	51
2.2.1 Cannula implantation and lentivirus injection	51
3 Third block of experiments: Determine relationship between memory enhancer effect of RGS14₄₁₄ and AMPA receptors	52
3.1 Experimental design.....	52
3.1.1 AMPA receptors mRNA quantification.....	53

3.1.2	GluR2 protein quantification	53
3.2	Methods.....	53
3.2.1	Dissection of area V2 of visual cortex from rat brain.....	53
3.2.2	qRT-PCR.....	53
3.2.3	Western Blot	59
4	Fourth block of experiments: Examine the effect of RGS14₄₁₄ treatment on Hebbian synaptic plasticity in perirhinal cortex.....	61
4.1	Experimental design.....	61
4.1.1	Effect of RGS14 ₄₁₄ gene treatment in perirhinal cortex on ORM	62
4.1.2	Evaluation of RGS14-mediated effect on synaptic plasticity	62
4.2	Methods.....	63
4.2.1	Slice preparation and electrophysiology	63
5	Fifth block of experiments: Analyze brain areas implicated in RGS14-mediated memory enhancement	67
5.1	Experimental design.....	67
5.1.1	RGS14-mediated enhancement in ORM after treatment in either areas V2, perirhinal cortex or frontal cortex	68
5.1.2	Study of dependence of brain areas implicated in RGS14-mediated ORM processing	69
5.2	Methods.....	70
5.2.1	Cresyl violet staining	70
IV.	RESULTS.....	71
1	Recovery of ORM loss by RGS14₄₁₄ gene treatment in area V2.....	73
1.1	Study in aging	73
1.2	Study in Alzheimer´s disease	74
2	Mechanism of memory enhancer activity of RGS14₄₁₄	75
2.1	Implication of AMPA/Kainate receptors	76
2.2	A dynamic expression of AMPA receptors in RGS-animals.....	77
2.2.1	An increase in GluR2 and GluR4 gene expression.....	77
2.2.2	Expression pattern of GluR2 protein during ORM processing.....	78
2.3	The relationship between ORM and synaptic plasticity in perirhinal cortex.....	79
2.3.1	RGS14 ₄₁₄ -mediated ORM enhancement in perirhinal cortex	79
2.3.2	Study of synaptic plasticity	80
3	Independent brain areas implicated in ORM processing.....	86
3.1	RGS14 enhancer effect on ORM in area V2, perirhinal and frontal cortices	86
3.2	Independent brain domains in ORM-processing	88
3.2.1	Independence of Area V2 in ORM	88
3.2.2	Independence of perirhinal cortex in ORM	90
3.2.3	Independence of frontal cortex in ORM	91
V.	DISCUSSION	93
1	Recovery of an episodic memory loss in aging and AD	95

2	Effect of RGS14 is mediated through GluR2	96
3	RGS14 does not facilitate the Hebbian synaptic plasticity	98
4	Independent brain areas can promote RGS-mediated recovery of ORM loss.....	99
5	Mechanism of RGS-mediated memory enhancement and recovery of ORM loss...100	
VI.	CONCLUSIONS.....	103
VII.	REFERENCES	107
VIII.	APPENDICES	121

I. Introduction

1 Regulator of G protein signaling 14 (RGS14)

Classically defined G protein signaling begins with a heterotrimeric G protein ($G\alpha\beta\gamma$) (Albert & Robillard 2002; Neves et al 2002) bound to a G protein-coupled receptor (GPCR). GPCR activation promotes guanosine diphosphate (GDP) release and subsequent guanosine triphosphate (GTP) binding to activate $G\alpha$. Activation of $G\alpha$ leads to dissociation/rearrangement of the heterotrimeric complex and allows $G\alpha$ and $G\beta\gamma$ to interact with downstream effectors. As a GTPase, the α -subunit then rapidly initiates its own inactivation through GTP-hydrolysis and returns to its basal state ($G\alpha$ -GDP), where it can bind $G\beta\gamma$ once more and reassociate with a GPCR (Gilman 1987; Hamm 1998; Hepler & Gilman 1992). This GTPase cycle of G protein activation and deactivation is subject to regulation by members of the regulators of G protein signaling (RGS) family. RGS proteins contain a canonical RGS domain of ≈ 120 amino acids, which binds activated G proteins and acts as a GTPase-activating protein (GAP) to catalyze GTP hydrolysis and accelerate the G protein cycle (De Vries et al 2000; Hollinger & Hepler 2002; Ross & Wilkie 2000; Woodard et al 2015) (figure 1).

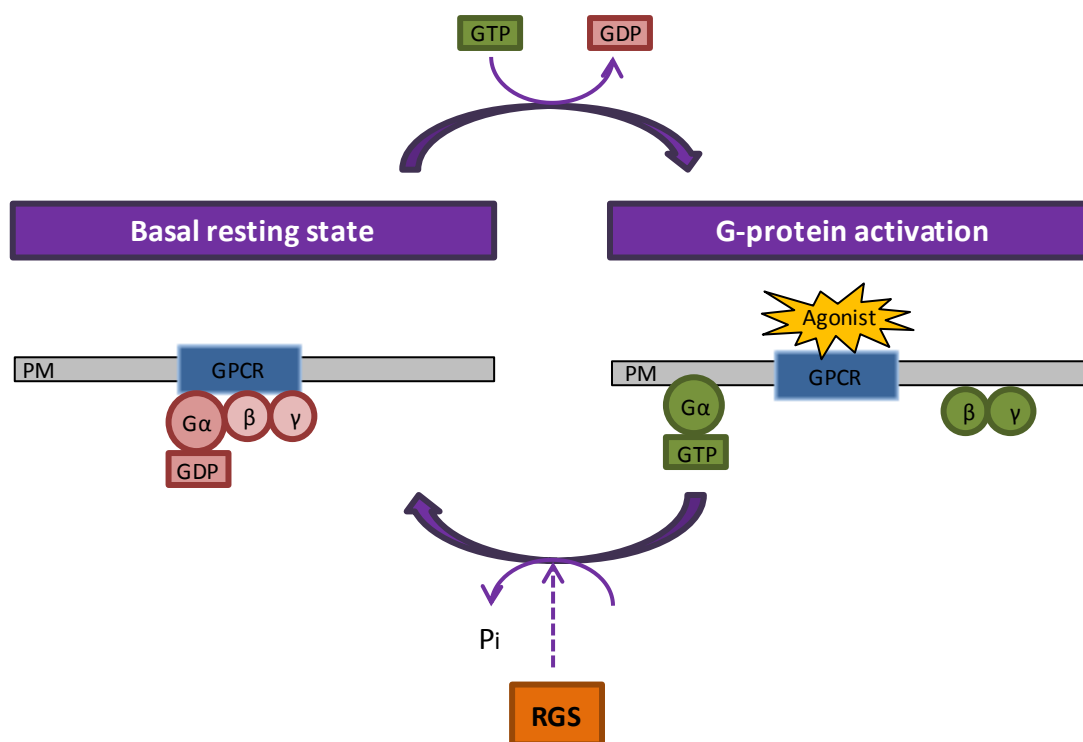


Figure 1. Diagrammatic representation of the activation of trimeric G proteins upon agonist binding to G-protein-coupled receptors. GDP: guanosine diphosphate; GTP: guanosine triphosphate; GPCR: G protein-coupled receptor; PM: plasma membrane; Pi: phosphate; RGS: regulator of G-protein signaling.

RGS14 is a member of R12 subfamily of RGS proteins. RGS14 has multiple domain structure: a N-terminal RGS domain of 119 amino acids; a C-terminal G protein regulatory (GPR, also known as GoLoco) domain of 22 amino acids; and two central tandem Raf-like Ras binding domains (RBD), RBD1 and RBD2, of 70 amino acids each one (figure 2).



Figure 2. Schematic illustration of the multidomain composition of RGS14 protein. The RGS14 domains are shown. A N-terminal RGS domain, a tandem Ras-binding domains (RBDs) and a C-terminal G-protein regulator (GPR) motif.

Therefore, it is believed that in addition to RGS domain-mediated GTP hydrolysis, RGS14 might also participate in many other cellular functions. This idea is further strengthened by a dynamic distribution pattern of RGS14 across the whole brain. Northern blot experiments (Snow et al 1997), *in situ* hybridization studies (Grafstein-Dunn et al 2001), and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) (Larminie et al 2004) have independently reported that RGS14 mRNA is present in rat and human brain tissue. Similarly, immunohistochemical studies (Lopez-Aranda et al 2006) and immunoblot experiments (Hollinger et al 2001) have found that RGS14 protein is enriched in rat and monkey brain. In the adult mouse brain, RGS14 mRNA and protein are predominantly found in CA2 hippocampal neurons, specifically within spines and dendrites (Lee et al 2010). Recently, a detailed anatomical analysis of RGS14 localization in mouse brain has demonstrated that RGS14 mRNA and protein are upregulated throughout postnatal mouse development, and that RGS14 protein exhibits a dynamic localization pattern that is enriched in hippocampus and primary olfactory cortex in the adult mouse brain (Evans et al 2014). Furthermore, *in vitro* studies have shown that RGS14 possesses unique capacity for interacting with distinct forms of $G\alpha$ subunits. As an RGS protein, RGS14 engages activated forms ($G\alpha$ -GTP) of the $G\alpha i/o$ subfamily to stimulate $G\alpha$ -directed GTP hydrolysis (Cho et al 2000a; Hollinger et al 2001; Traver et al 2000; Traver et al 2004). Through its GPR motif, RGS14 selectively binds either inactive $G\alpha i1$ -GDP or $G\alpha i3$ -GDP to inhibit GDP dissociation and target RGS14 to the plasma membrane (Kimple et al 2001; Mittal & Linder 2004; Shu et al 2007). In addition, through its RBD1 domain, RGS14 binds H-Ras and Rap2 allowing RGS14 to engage H-Ras signaling pathways (Mittal & Linder 2006; Shu et al 2010; Willard et al 2009). At present, there are no known binding partners of RBD2.

2 RGS14₄₁₄, a spliced variant of RGS14

The RGS14 gene (GenBank, NP_006471.2) encodes a human protein of 566 amino acids (RGS14₅₆₆, Uniprot, O43566-7). Three alternate transcriptional splice variants of this gene have been observed, but they have not been thoroughly characterized. RGS14 spliced gene (GenBank, AY987041) of 1245 base pairs encodes the third isoform of RGS14 protein with 414 amino acids (RGS14₄₁₄, Uniprot, O43566-5) (Lopez-Aranda et al 2006). The sequence of this isoform (RGS14₄₁₄) differs from the canonical sequence (RGS14₅₆₆). Because it presents a deletion of the first 153 amino acids, an insertion of a lysine in the position 352 as well as a substitution of a valine in the position 416 by an alanine (figure 3). Therefore, considering the absence of crucial RGS domain for GTPase activity, we argue that mature protein of RGS14₄₁₄ is very distinct from RGS14₅₆₆ and it might be exclusively involved in brain functions that are not associated with GTP hydrolysis.

RGS14 ₅₆₆	MPGKPKHLGVPNGRMVLAUSDGELSSTTGPQGQEGRGSLSLSIHSLPSGPSSFPFTEEQP	60
RGS14 ₄₁₄	-----	
RGS14 ₅₆₆	VASWAL ^S FERLLQDPLGLAYFTEFLKKEFSAENVTFWKACERFQQIPASDTQQLAQEARN	120
RGS14 ₄₁₄	-----	
RGS14 ₅₆₆	IYQEFLLSSQALSPVNI ^R QAWLGEEVLAEP ^R PD ^M FRAQQ ^L QIFNLMKFDSYARFVKSPLY	180
RGS14 ₄₁₄	-----MFRAQQ ^L QIFNLMKFDSYARFVKSPLY	27
RGS14 ₅₆₆	RECLLAEAEGRPLREPGSSRLGSPD ^A TRKKPKLPGKSLPLGVEELGQLPPVEGPGGRPL	240
RGS14 ₄₁₄	RECLLAEAEGRPLREPGSSRLGSPD ^A TRKKPKLPGKSLPLGVEELGQLPPVEGPGGRPL	87
RGS14 ₅₆₆	RK ^S FRRELGGTANAALRR ^S QGS ^L NSSASLDL ^G FLAFVSSK ^S ESH ^R KS ^L GL ^S TEGE ^S ES ^R P	300
RGS14 ₄₁₄	RK ^S FRRELGGTANAALRR ^S QGS ^L NSSASLDL ^G FLAFVSSK ^S ESH ^R KS ^L GL ^S TEGE ^S ES ^R P	147
RGS14 ₅₆₆	GKYCCVYLPDGTASLALARPGLTIR ^D MLAGICEK ^R GLSL ^P DIK ^V YLVGNEQ ^K ALVLDQDC	359
RGS14 ₄₁₄	GKYCCVYLPDGTASLALARPGLTIR ^D MLAGICEK ^R GLSL ^P DIK ^V YLVGNEQ ^K ALVLDQDC	207
RGS14 ₅₆₆	TVLADQEVRL ^N RI ^T FELELTAL ^E RVV ^R ISAK ^P TK ^R LQ ^E ALQ ^P ILEKH ^G LS ^P LEV ^L HL ^R FP	419
RGS14 ₄₁₄	TVLADQEVRL ^N RI ^T FELELTAL ^E RVV ^R ISAK ^P TK ^R LQ ^E ALQ ^P ILEKH ^G LS ^P LEV ^L HL ^R FP	267
RGS14 ₅₆₆	GEKQPLDLGKLVSSVAAQRLVLD ^T LP ^G VKISKARDKSPCRSQGCP ^P RTQDKATH ^P PPASP	479
RGS14 ₄₁₄	GEKQPLDLGKLVSSVAAQRLVLD ^T LP ^G VKISKARDKSPCRSQGCP ^P RTQDKATH ^P PPASP	327
RGS14 ₅₆₆	SSLVKVPSSATGKRQ ^T CD ^I EGLV ^E LLNRVQSSGAHD ^Q RGL ^L RKEDLV ^L PEFLQ ^L PAQ ^G PS	539
RGS14 ₄₁₄	SSLVKVPSSATGKRQ ^T CD ^I EGLV ^E LLNRVQSSGAHD ^Q RGL ^L RKEDLV ^L PEFLQ ^L PAQ ^G PS	387
RGS14 ₅₆₆	SEETPPQTKSAAQPIGGSLN ^S T ^T D ^S AL	566
RGS14 ₄₁₄	SEETPPQTKSAAQPIGGSLN ^S T ^T D ^S AL	414

Figure 3. Alignment of translated peptide sequence of RGS14₄₁₄ (GenBank accession number: AY987041) and RGS14₅₆₆ (GenBank accession number: NP_006471.2). The different domains are indicated in colors: RGS domain in yellow, RBD1 domain in green; RBD2 domain in blue and GPR domain in violet. Non-identical residues are shown in red.

2.1 Object recognition memory and RGS14₄₁₄

2.1.1 Object recognition memory (ORM)

One of the most widely studied examples of episodic memory is recognition memory, the process of identifying when something (e.g. an object, a person) has been encountered previously. Recognition memory is widely viewed as consisting of two components: recollection and familiarity (Diana et al 2007; Yonelinas 2001; Yonelinas et al 2010). Interest in this distinction greatly increased when Brown and Aggleton (Brown & Aggleton 2001) proposed a neuroanatomical basis for these two processes. Their proposal was that recollection depends on the hippocampus, whereas familiarity depends on the adjacent perirhinal cortex. However, there is still some debate as to which regions in the medial temporal lobe (MTL) are necessary to support these processes (Eichenbaum et al 2007). In contrast to this dual-process model, other researchers argue that recognition memory is a single process dependent on both the hippocampus and adjacent cortex (Donaldson 1996; Haist et al 1992; Squire et al 2004; Squire et al 2007). Such models state that recognition memory is a process based on familiarity, where ‘knowing’ reflects weaker memory and ‘remembering’ is associated with strong memory.

It has been demonstrated that, in addition to perirhinal cortex (Brown & Aggleton 2001; Kim et al 2014; Lech & Suchan 2013; Martin et al 2013; Ranganath & Ritchey 2012; Warburton & Brown 2010; Watson & Lee 2013), other cortical areas are involved in the ORM circuit, such as frontal cortex (Banks et al 2012; Swick & Knight 1999; Warburton & Brown 2010) and more recently area V2 of visual cortex (Lopez-Aranda et al 2009). Until now, it has been thought that area V2 participates in visual perception and not in memory. However, recent finding from this laboratory on role of area V2, an area localized outside MTL, in ORM not only put on the spotlight this brain area, but also supported the view that entire ventral visual-to-hippocampal stream and not the MTL alone, is important for memory processing (Bussey & Saksida 2005; 2007; Gaffan 2002; Murray et al 2007).

2.1.2 Role of RGS14₄₁₄ in the ORM

A previous study in our laboratory (Lopez-Aranda et al 2009) have shown that area V2, an area localized outside the MTL, plays a critical role in ORM. Stimulation of area V2 by overexpression of RGS14₄₁₄ led to a robust memory enhancement. This effect on ORM

was to such extent that converted an ORM normally lasting for 45 min (short-term) into long-lasting long-term memory that could be traced even after many months. A selective elimination of area V2 neurons resulted in complete loss of normal as well as RGS14₄₁₄-mediated enhanced ORM. Furthermore, we found that the capacity to hold information on multiple objects in memory was also more than three fold high in RGS14 animals. Normal animals could retain information of two different objects, but they were unable to do so for four objects while RGS14 animals were able to retain information in memory of six objects. In addition, we observed that the effect of a single RGS14₄₁₄ treatment persisted for whole lifetime of rats. Therefore, together these findings suggest that RGS14₄₁₄ is a potent memory enhancer and it might serve as good therapeutic candidate for treatment against memory loss.

3 Implication of perirhinal Hebbian synaptic plasticity in recognition memory

3.1 The perirhinal projections

Perirhinal cortex in rat brain is composed of Brodmann's areas 35 and 36 and it is located along the rhinal sulcus (Burwell 2001; van Strien et al 2009). Although the most prominent of all afferent cortical projections to the perirhinal cortex is the one originating in entorhinal cortex (Burwell & Amaral 1998b; Canto et al 2008; Insausti et al 1997), the temporal association cortex also provides a large input to the perirhinal cortex (Burwell & Amaral 1998a). Perirhinal cortex receives therefore information from the sensory systems fed forward through temporal cortex and information fed back from the hippocampal formation via the entorhinal cortex. Inputs from the neighboring entorhinal and temporal cortices terminate heavily in layers I, II and III (Agster & Burwell 2013; Furtak et al 2007).

3.2 Hebbian synaptic plasticity in perirhinal cortex

Hebbian synaptic plasticity specifically refers to the activity-dependent modification of the strength or efficacy of synaptic transmission at preexisting synapses (Citri & Malenka 2008; Feldman 2009). The most prominent forms of this plasticity observed at excitatory synapses are long-term potentiation (LTP), which is a persistent increase in synaptic strength induced by brief high-frequency stimulation, and long-term depression (LTD), which is a persistent decrease in synaptic strength induced by longer episodes of low-frequency stimulation. There are different mechanisms in perirhinal cortex that contribute to synaptic

plasticity. These include the activation of NMDA receptors, mGlu receptors, muscarinic cholinergic receptors, and voltage-gated calcium channels (for review see Banks et al 2012; Banks et al 2014; Kealy & Commins 2011). A 100 Hz high frequency stimulation (HFS) in layers II/III neurons of the perirhinal cortex produces NMDA receptor-dependent LTP (Bilkey 1996), and tetanic and theta-burst stimulation at 100 Hz in layers II/III can also induce NMDA receptor-dependent LTP in layer I neurons (Ziakopoulos et al 1999). However, 1 Hz and 5 Hz low frequency stimulation (LFS) can induce NMDA receptor-dependent perirhinal reversal of LTP (depotentialiation) and LTD, respectively (Aicardi et al 2004; Massey et al 2004). In addition to LTD that relies on glutamatergic neurotransmission, there appears to be other forms of LTD in the perirhinal cortex. It has been shown that a range of mGlu receptor agonists (specific for group I, II and III mGlu receptors) (Cho et al 2000b; McCaffery et al 1999) and muscarinic M1 cholinergic receptor agonists (Massey et al 2001) can also induce perirhinal LTD without electrical stimulation or NMDA receptor activation.

3.3 LTP/LTD in recognition memory

Patterns of long-term synaptic plasticity have been proposed to underlie several forms of cognition, including recognition memory (Abraham & Robins 2005; Bliss & Collingridge 1993; Collingridge et al 2010; Davis et al 1992; Griffiths et al 2008; Martin & Morris 2002; Morris et al 1986; Whitlock et al 2006). LTD in perirhinal cortex has particularly received much attention and it has been described as a potential substrate for recognition memory. Many of the substances that block LTD, but not LTP, also disrupt recognition memory *in vivo* (Barker et al 2006; Griffiths et al 2008; Seoane et al 2009; Warburton et al 2003). Evidence for the involvement of different signaling pathways in perirhinal plasticity mechanisms and recognition memory are reviewed in Banks et al 2012 .

4 Memory loss in Alzheimer's disease and aging

Owing to its clinical importance, the episodic memory system is among the most thoroughly studied in cognitive neuroscience. Episodic memory function is extremely sensitive to cerebral aging, psychiatric (Dere et al 2010), and neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease (Williams-Gray et al 2006) and Alzheimer's disease. Here we will focus on episodic memory loss in aging and Alzheimer's disease, two conditions that are considered representative of memory loss in human. In addition, these both models will become part of my thesis research work.

4.1 Aging

Although much of the research conducted on memory loss focuses on Alzheimer's disease, aging in the absence of Alzheimer's pathology is itself associated with impairments in episodic memory (Drag & Bieliauskas 2010; Nyberg et al 2012; Shing et al 2010). This episodic memory decline in normal aging is related to volumetric reductions of hippocampus and other medial temporal lobe structures (Fjell et al 2014; Nyberg et al 2012; Persson et al 2012; Rodrigue & Raz 2004). However, due to substantial atrophy in prefrontal cortex (Fjell et al 2009; Raz et al 2005) and accompanying deficits in specific cognitive functions, it has been suggested that decline in efficiency of fronto-striatal networks may be responsible for memory decline in aging (Buckner 2004; Head et al 2005).

Synaptic plasticity in the hippocampus and neocortex changes with aging (for review see Burke & Barnes 2006; Foster 2007). In aged animals, LTP induction is impaired when afferent stimulation is weak but not when robust high intensity HFS is used (Diana et al 1994a; Diana et al 1994b; Dieguez & Barea-Rodriguez 2004). Aged animals show either a higher threshold for LTP induction (Barnes et al 2000; Barnes et al 1996) or a decreased level of LTP induction compared with young animals (Deupree et al 1991; Moore et al 1993; Rosenzweig et al 1997; Tombaugh et al 2002). Conversely, the capacity for LTD induction and for LTP reversal is larger in aged than young rats (Foster & Norris 1997; Norris et al 1996).

4.2 Alzheimer's disease

Deterioration of episodic memory is the central clinical feature of Alzheimer's disease (AD) and it is considered among the earliest signs and symptoms. Therefore, a major goal in AD research is to identify these early cognitive changes during the course of the disease, which would allow therapies to be initiated in patients a time when maximum effect is expected to produce (Didic et al 2011; Dubois et al 2007; Salmon 2012). Currently, episodic memory impairments in AD are associated with the atrophy in entorhinal cortex and hippocampus (Acosta-Cabronero et al 2010; Killiany et al 2002; Petersen 2000). Importantly, AD neurofibrillary pathology affects the more medial portion of perirhinal cortex before it spreads to the entorhinal cortex and hippocampus (Braak & Braak 1991; 1995; Gertz et al 1998; Taylor & Probst 2008). These findings suggest that cognitive functions associated with the perirhinal cortex may be of additional importance for early detection of AD.

Amyloid-beta protein ($A\beta$) has been shown to inhibit LTP, while enhancing LTD in rodents (Cheng et al 2009; Kim et al 2001; Li et al 2009; Shankar et al 2008). However, negative effects of $A\beta$ on LTP seem to be highly concentration dependent, as low $A\beta$ levels can actually facilitate the maintenance of LTP (Puzzo et al 2011; Puzzo et al 2008). Furthermore, LTP studies on transgenic mouse models for AD have unfortunately generated mixed and often contradictory results. Several groups have shown a decrease in LTP (Chong et al 2011; Gong et al 2004; Knobloch et al 2007; Saganich et al 2006; Sydow et al 2011; Trinchese et al 2004), while others have reported unaltered LTP (Chapman et al 1999; Fitzjohn et al 2010; Gurevicene et al 2004; Harris et al 2010; Marchetti & Marie 2011; Palop et al 2007).

5 Mechanism of memory enhancement

Very little is known about the mechanism that underlies RGS14₄₁₄ protein-mediated memory enhancement. Previously, an *in vitro* study has demonstrated the participation of RGS14₄₁₄ protein in regulation of intracellular Ca^{2+} levels (Martin-Montanez et al 2010), a process considered essential for synaptic plasticity and memory formation (for review see Baker et al 2013). With the use of two different cell lines of neuronal origin and two different Ca^{2+} measurement methods, we found that the expression of RGS14₄₁₄ protein into these cell lines substantially reduced Ca^{2+} influx and that this reduction in Ca^{2+} was mediated through nifedipine-sensitive Cav1 channels. Though, it remains to be shown how preventing higher Ca^{2+} levels into cytoplasm by reducing Ca^{2+} influx through Cav1 channels can translate into memory enhancement.

However, in contrast to RGS14₄₁₄, an extraordinary progress has been made in the understanding of mechanisms that are engaged in memory processing (for review see Lee & Silva 2009; Stern & Alberini 2013). Given the vast literature on pharmacological compounds or approaches that modulate memory, it is not feasible to cite every possible pathway. Instead we will focus on some that will become part of this thesis work.

α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. AMPA receptors are cation-permeable ionotropic glutamate receptors and they are expressed throughout the brain (Beneyto & Meador-Woodruff 2004). The four AMPA receptor subunits (GluA1-GluA4 or GluR1-GluR4) are highly homologous (Collingridge et al 2004) and are assembled as dimers-of-dimers to form heterotetrameric receptors (Hollmann & Heinemann 1994; Traynelis et al 2010). Homotetrameric receptors have also been reported (Lu et al 2009;

Wenthold et al 1996). There are evidences for the involvement of AMPA receptor endocytosis in perirhinal-dependent object memory processing in rats (Griffiths et al 2008; Winters & Bussey 2005). In addition, blockade of AMPA receptors in perirhinal cortex impairs ORM in macaques (Malkova et al 2015). GluR2 is the most abundant subunit of AMPA receptors in adult brain and majority of GluR2-containing AMPA receptors are largely Ca^{2+} -impermeable (Greger et al 2003). They also show a lower single channel conductance (Cull-Candy et al 2006; Traynelis et al 2010) along with a slightly increased decay time. In contrast, GluR2-lacking AMPA receptors are Ca^{2+} -permeable, and they bear a higher single channel conductance (Swanson et al 1997) with faster rise and decay kinetics. GluR2 plays a critical role in synaptic plasticity and memory (Cazakoff & Howland 2011; Mead & Stephens 2003; Miguez et al 2010). On the other hand, GluR4 subunit expression is distributed throughout the central nervous system, but is relatively high in the hippocampus, cerebral cortex and the granule cells of the cerebellum (Keinanen et al 1990). In hippocampus, high GluR4 expression is largely restricted to the first postnatal week, and the GluR4 subunit mediates the delivery of GluR2-containing AMPA receptors (Zhu et al 2000). GluR4 knockout mice showed improved spatial working memory and no alteration in the LTP suggesting the involvement of GluR4 in cognitive function (Sagata et al 2010).

N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. NMDA receptors are heteromers (Dingledine et al 1999) and they are composed of two essential NR1 subunits (Behe et al 1995) and two or three NR2 subunits (Laube et al 1998; Premkumar & Auerbach 1997). There are four NR2 subunits (A-D), but NR2A and NR2B subunits predominate in forebrain. There are evidences for the implication of NMDA in ORM in perirhinal cortex of macaques (Malkova et al 2015) and rats (Abe et al 2004; Winters & Bussey 2005).

Metabotropic glutamate (mGlu) receptors. The mGlu receptor family consists of eight receptor subtypes (mGluR1-8) and they are divided into: group I, which is comprised of mGluR1 and mGluR5; group II, which is composed of mGluR2 and mGluR3; group III, which includes mGluR4, mGluR6, mGluR7, and mGluR8. These groups are formed based on sequence homology, pharmacological profile, and implication into signal transduction pathways (Conn & Pin 1997). Previous studies have shown the role of group I and group II mGlu receptors in acquisition of long-term ORM, but not in the consolidation or retrieval (Barker et al 2006).

Muscarinic cholinergic (mACh) receptors. mACh receptors belong to seven transmembrane G protein-coupled receptors superfamily and they are comprised of five subtypes, M1-M5 (Bonner et al 1987). It has been shown that inhibition of mACh receptors by antagonists causes disruption in ORM (Abe et al 2004; Tinsley et al 2011; Warburton et al 2003). Further studies have demonstrated that this memory impairment is produced by antagonism of muscarinic M1 receptors (Tinsley et al 2011).

Voltage-dependent calcium (VDC) channels. VDC channels are subdivided into various subfamilies: L-type VDC channels (Cav1 family); T-type VDC channels (Cav3 family); P/Q-type, R-type and N-type VDC channels (Cav2 family) (Catterall et al 2005). L-type VDC channels are major sites for calcium ion entry into neurons (Berger & Bartsch 2014; Chittajallu et al 1998). The transient inactivation of L-type VDC channels impairs fear conditioning passive avoidance learning, spatial memory and ORM (Bauer et al 2002; Borroni et al 2000; Lashgari et al 2006; Seoane et al 2009; Winters et al 2007; Woodside et al 2004).

Protein kinase M ζ (PKM ζ). PKM ζ is a PKC isoform that contains a ζ catalytic domain without the N-terminal regulatory domain, rendering it constitutively active (Sacktor 2011). It is expressed exclusively in the brain and is enriched in the hippocampus and neocortex (Hernandez et al 2003; Oster et al 2004). PKM ζ plays a role in maintenance of hippocampus-dependent memory (Hardt et al 2010; Hernandez et al 2003; Serrano et al 2008). This protein kinase exerts its function by blocking a GluR2-dependent pathway for removal of AMPA receptors from postsynaptic site and thus, it promotes continual localization of GluR2 at the synapse (Migues et al 2010). In contrast to many short-acting molecules involved in memory formation, PKM ζ is unique in that, its persistent activity is critical for storage of memory, long after its formation (Sacktor 2011; Shema et al 2011; Shema et al 2009). However, a recent study (Volk et al 2013) has refuted this model of memory formation and has demonstrated that PKM- ζ is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory.

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). CaMKII is a multifunctional serine/threonine kinase with a broad range of substrates. In mammals, CaMKII is comprised of four isoforms: α , β , γ and δ (Lucchesi et al 2011). α and β isoforms are primarily localized in the brain, whereas γ and δ isoforms are ubiquitously expressed. CaMKII α is highly expressed in forebrain where it constitutes a major post-synaptic density

(PSD) protein (Cheng et al 2006). Little is known about the function of CaMKII β in brain and virtually nothing about γ and δ isoforms. CaMKII has been studied extensively in relation to memory formation. Its activity is increased during memory formation and blockade of CaMKII substantially impairs memory formation (Coultrap & Bayer 2012; Elgersma et al 2004; Irvine et al 2006; Lisman et al 2002; Lucchesi et al 2011; Tinsley et al 2009; Wayman et al 2008).

Mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) signaling. MAPKK, also known as MEK, is a kinase enzyme that phosphorylates mitogen activated protein kinases (MAPKs), such as extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 and JNK. These MAPKKs are part of three kinase signaling cascades where MAPK kinase kinase (MKKK) activates MAPK kinase (MKK) that in turn activates a MAPK. So far, seven MEK subtypes have been identified: MEK1 and MEK2 that are closely related and activate ERK1/2 participating in the Ras/Raf/MEK/ERK signal transduction cascade; MEK3 and MEK6 that are functionally similar and activate p38 MAP kinase; MEK4 and MEK7 that work synergistically and activate JNK protein kinases; and MEK5 which activates ERK5, also known as big MAP kinase 1 (BMK1). Upon activation, MAPKs can phosphorylate a variety of intracellular targets, including transcription factors, transcriptional adaptor proteins, membrane and cytoplasmic substrates, and other protein kinases (Akinleye et al 2013). Numerous studies have shown that activation of the MAPKKs is critical for memory formation. A number of studies using pharmacological inhibitors of MEK demonstrated that activation of ERK is necessary for consolidation of long-term memories, including ORM (Berman et al 2000; Davis & Laroche 2006; Hebert & Dash 2002; Kelly et al 2003; Leon et al 2010; Lu et al 2001; Schafe et al 2000; Shalin et al 2004), and furthermore, inhibition of upstream kinase, MEK, results in impaired memory (Davis & Laroche 2006).

Poly ADP-ribosylation. Poly ADP-ribosylation is a post-translational modification of nuclear proteins, catalyzed by poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs) (Ame et al 2004; Lautier et al 1993; Rouleau et al 2004; Schreiber et al 2006). In the nucleus, poly ADP-ribosylation catalyzed by PARP-1 participates in protein–protein and protein–DNA interactions, and it is implicated in chromatin remodeling, DNA transcription, and repair (Ju et al 2004; Rouleau et al 2004). PARP-1 also acts within ERK signaling cascade that mediates growth and differentiation (Cohen-Armon 2007; Cohen-Armon et al 2007). Previous results linked the activation of PARP-1 with long-term memory formation (Cohen-Armon et al 2004;

Goldberg et al 2009) and memory consolidation (Fontan-Lozano et al 2010). Furthermore, a recent study showed that NGF promoted synaptic plasticity and long-term memory formation by activating PARP-1-mediated protein ribosylation and activation of PKA-CREB pathway (Wang et al 2012).

Figure 4 summarizes the signaling transduction pathways underlying recognition memory. For more details, please follow poster from Tocris named *Neurotransmitters of Synaptic Plasticity, Learning and Memory in the Perirhinal Cortex* by Warburton & Bashir, 2011.

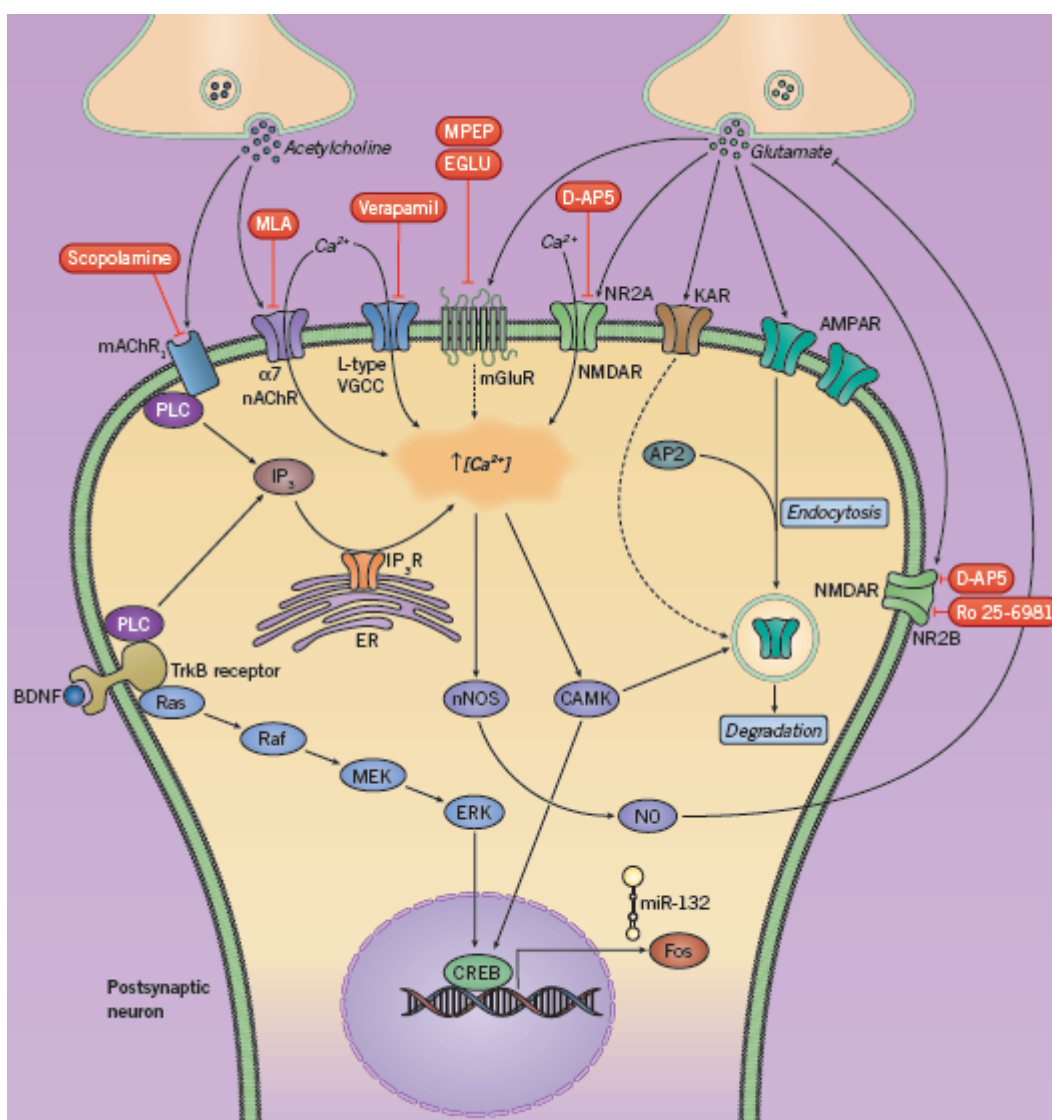


Figure 4. Schematic representation of the cellular mechanisms of recognition memory. (from Tocris)

II. Objectives

Previously, we have shown that RGS14₄₁₄ protein is a potent memory enhancer and treatment with its gene into area V2 of visual cortex of rodent's brain produced robust enhancement in object recognition memory, which is one of the most studied examples of episodic memory. Therefore, we have tested first whether object recognition memory loss observed in normal aging and Alzheimer's disease can be recuperated by the same RGS14₄₁₄ gene treatment. Further, we explored through various biological processes in brain to provide explanation of RGS14-mediated memory enhancement and recuperation of memory loss.

Objective 1: Explore the effect of RGS14₄₁₄ gene treatment in recovery of an episodic memory loss

A number of psychiatric and neurological disorders are associated mainly with episodic memory impairments. Alzheimer's disease and age-related cognitive decline are clear examples of it (see section I.4). Therefore, in this objective, using Alzheimer's disease-mice and normal aged rats, two most studied rodent models that have consistently exhibited a loss in episodic memory, we have evaluated whether RGS14 gene treatment can serve as an effective therapy against memory loss or not.

Objective 2: Identify pathways implicated in RGS14₄₁₄-mediated memory enhancement

A great deal of effort is made to understand underlying mechanism of RGS14₄₁₄-mediated memory enhancement seen in rats after a treatment. Here, we have performed pharmacological studies using antagonists or inhibitors to elucidate pathways that are implicated in memory enhancement.

Objective 3: Determine relationship between memory enhancer effect of RGS14₄₁₄ and AMPA receptors

In objective 2, we identified the involvement of AMPA receptors in memory enhancement. Therefore, taking into consideration the involvement of AMPA receptors in object recognition memory processing (Griffiths et al 2008; Malkova et al 2015; Winters & Bussey 2005), we have evaluated the participation of these receptors in RGS14-mediated memory processing.

Objective 4: Examine the effect of RGS14₄₁₄ treatment on Hebbian synaptic plasticity in perirhinal cortex

Given the vast literature describing synaptic plasticity as a potential substrate for recognition memory, we wanted to evaluate whether synaptic plasticity is implicated in RGS-mediated memory enhancement. Therefore, we have performed electrophysiological studies in perirhinal cortex of brain slices of RGS-treated animals. Perirhinal cortex is a structure that is considered crucial for processing of object recognition memory.

Objective 5: Analyze brain areas implicated in RGS14-mediated memory enhancement

In this objective, we have looked into the relationship between area V2, perirhinal and frontal cortices, areas that are part of brain circuit associated with object recognition memory. First, we have evaluated the effect of RGS14 treatment on object recognition memory in these areas and then, determined whether a substantial damage through lesion to these areas can independently produce object recognition memory loss, conditions simulating to brain diseases and/or aging. Furthermore, we explored whether RGS14 treatment in one of the areas in these lesion-induced memory-deficient conditions was adequate to normalize memory loss similar to as rodent models in objective 1.

III. Materials and methods

1 First block of experiments: Explore the effect of RGS14₄₁₄ gene treatment in recovery of an episodic memory loss

1.1 Experimental design

A test of the effect of RGS14₄₁₄ gene treatment on recuperation of object recognition memory (ORM) loss was performed in two different rodent models representing aging and Alzheimer's disease. A summary of experimental design is in figure 5.

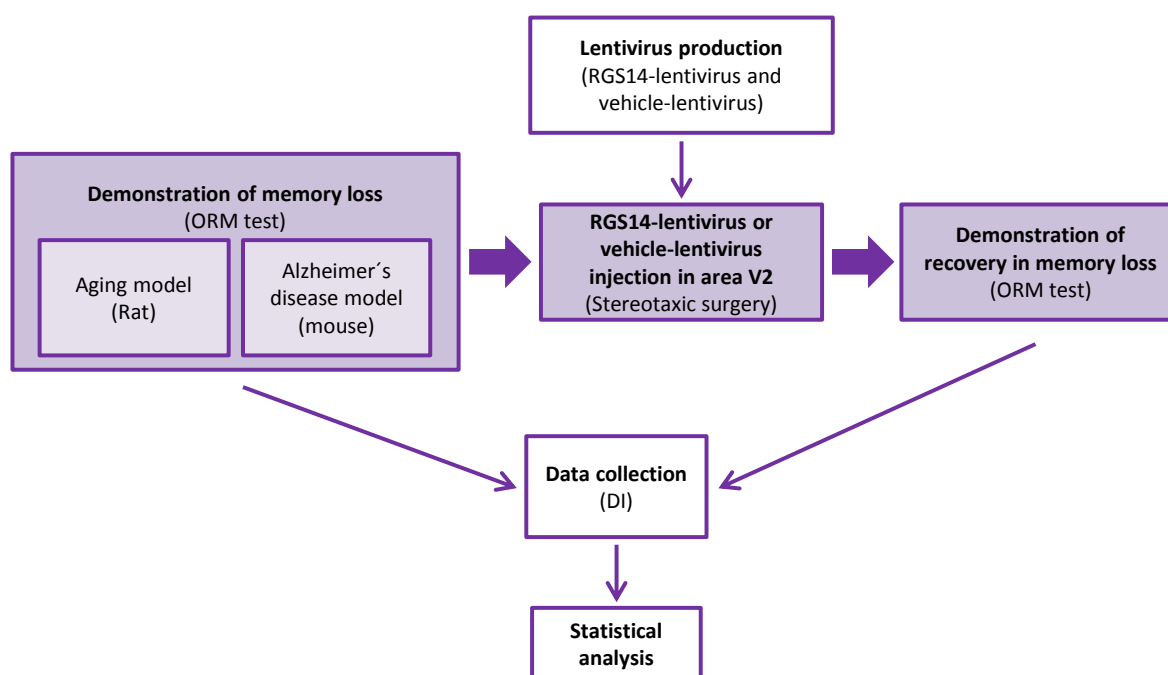


Figure 5. A scheme of experimental design.

1.1.1 Effect of RGS14 in aging

Male Wistar Han rats of 3-24 months, obtained from Charles River, were used in this study. ORM test were carried out in following two phases to evaluate memory statuses of these animals (section III.1.2.4):

(i) *Memory loss confirmation in aging rats*: ORM tests with 45 min and 24 h delays were performed in 16 rats of 3 months of age and at the age of 18 months, ORM test was repeated with 45 min delay to confirm memory loss.

(ii) *Study of the recovery of memory loss after RGS14₄₁₄ gene treatment*: After determination of ORM status at 18 months, from the 16 rats, 7 rats were injected with RGS14-lentivirus (RGS14 group) in area V2 (sections III.1.2.1 and III.1.2.2.2) and 9 rats were injected with lentivirus-vehicle control (vehicle group). At 20 and 24 months of age, ORM test was repeated with 45 min and/or 24 h delay.

1.1.2 Effect of RGS14 in transgenic mice with Alzheimer's disease

2 to 10 months old transgenic mice with Alzheimer's disease (AD-mice) of J20 line (strain B6.Cg-Tg(PDGFB-APP^{SwInd})20Lms/2Mmjax) were obtained from Jackson Laboratory. These mice overexpress human β -amyloid precursor protein (hAPP) with Swedish (K670N/M671L) and Indiana (V717F) familial AD mutations under control of platelet-derived growth factor B chain promoter (PDGF) (Mucke et al 2000). These mice present ORM loss from the age of 4 months (Escribano et al 2009). For current study, in addition to AD-mice, we have used wild-type mice of C57BL/6J strain as control of same age. Experimental design of AD-mice also consists of first phase of memory loss confirmation, and second phase of evaluation of RGS-mediated recovery in memory loss.

(i) Wild-type control group (16 C57BL/6J-mice) and AD-mice group (12 J20-mice) were monitored for their ORM statuses at the age of 2 and 4 months to determine the age of appearance of memory loss (section III.1.2.4).

(ii) AD-mice+RGS14 group (15 RGS-treated J20 mice in area V2) and AD-mice+vehicle group (8 vehicle-treated J20 mice in area V2) (sections III.1.2.1 and III.1.2.2.2) together with wild-type control group and AD-mice group from (i) were subjected to ORM test at the ages of 7 and 10 months for monitoring their ORM statuses.

1.2 Methods

1.2.1 Preparation of lentivirus

A summary of methodological approach for lentivirus preparation is described in figure 6.

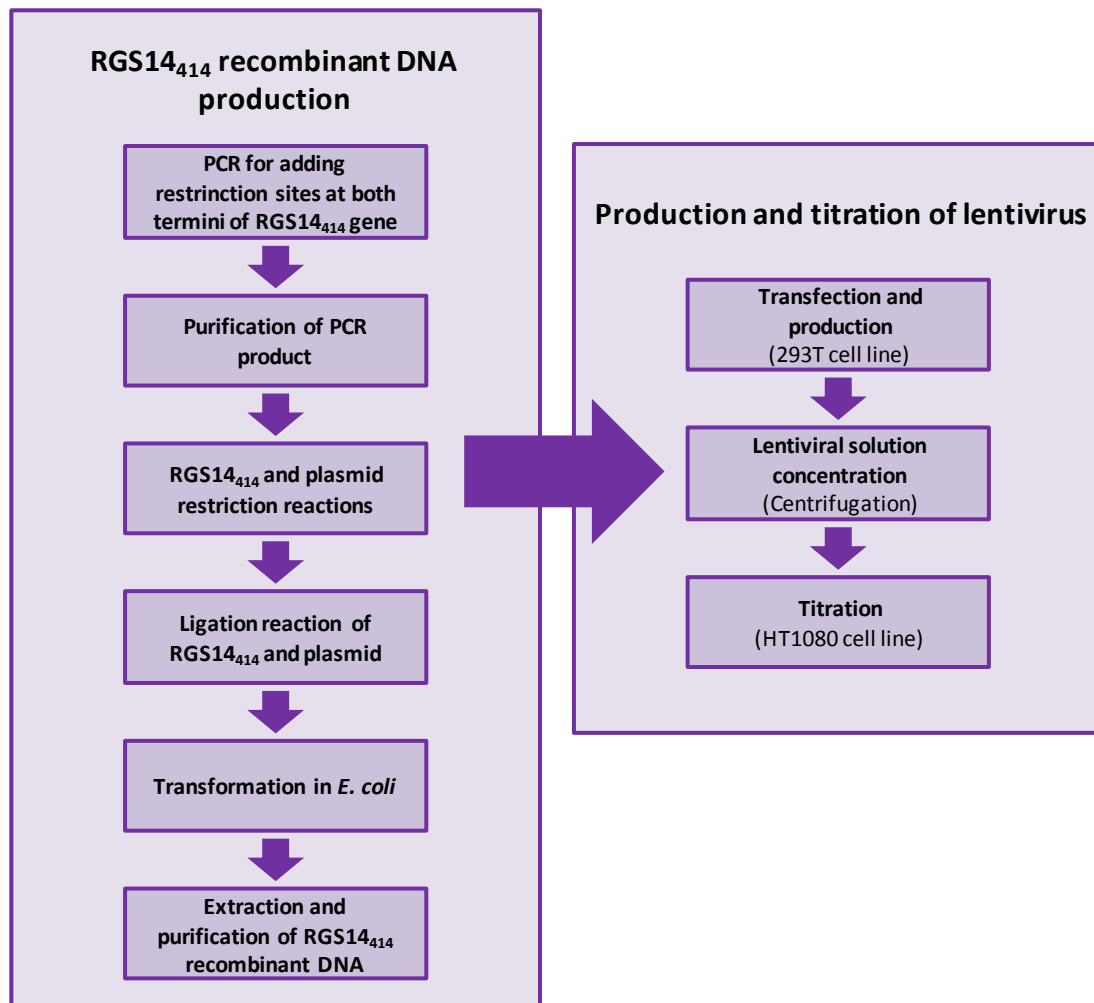


Figure 6. Scheme for the production of RGS14-lentivirus.

1.2.1.1 Construction of recombinant RGS14₄₁₄

1.2.1.1.1 RGS14₄₁₄ gene

A 1245 base pair (bp) RGS14₄₁₄ gene was originally cloned from human brain (GenBank, AY987041) (Lopez-Aranda et al 2006), which translates to a protein of 414 amino acids (Uniprot, O43566-5) (for more details see section I.2).

1.2.1.1.2 Lentiviral plasmid

The plasmid *pLVX-DsRed-Monomer-C1* was obtained from Clontech (Cat. number 632153) for insertion of RGS14₄₁₄ gene. This vector is based on lentivirus HIV-1 and is 8800 bp long. RGS14₄₁₄ gene was cloned into multiple cloning site (MCS) placed in the carboxyl terminus of DsRed Monomer sequence. This vector allowed the expression of RGS14₄₁₄ gene fused to DsRed-Monomer, a monomeric mutant of the *Discosoma* specie red fluorescent protein, and therefore, facilitated the identification of RGS14-protein expression in brain

cells. This plasmid encompassed all of the viral processing elements necessary for the production of replication-incompetent lentivirus (Wu et al 2000), as well as elements to improve viral titer and transgene expression (figure 7).

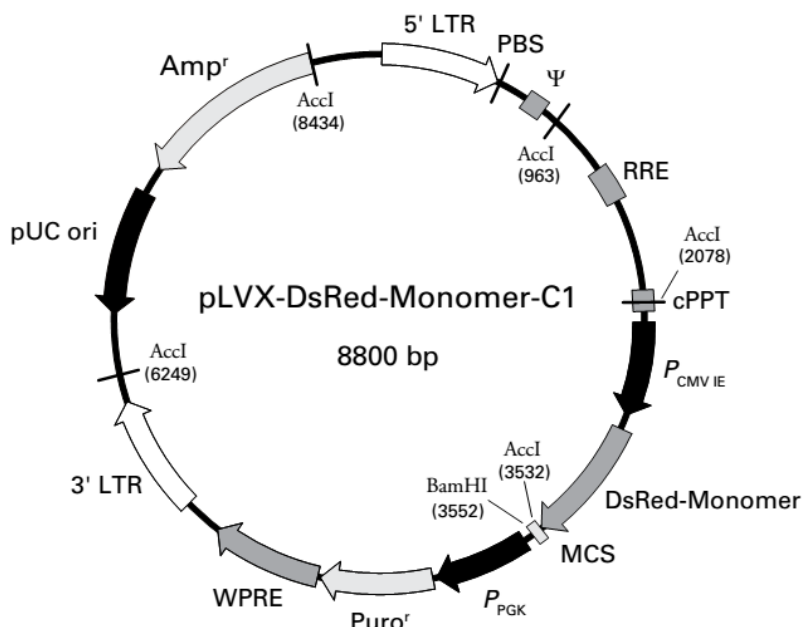


Figure 7. pLVX-DsRed-Monomer-C1 vector map. PBS: primer binding site; DsRed-Monomer: monomeric mutant of the *Discosoma sp* red fluorescent protein sequence; MCS: the multiple cloning site; pUC: the *Escherichia coli* replication origin; cPPT: the central polypurine tract element; WPRE: the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; Amp^r y Puro^r: ampicillin and puromycin resistance genes respectively; P_{PGK}: the murine phosphoglycerate kinase promoter; Ψ: Psi packaging signal; PRE: the Rev-response element, 3' and 5' LTRs: long terminal repeats; P_{CMV IE}: the human cytomegalovirus immediate early promoter (image taken from Clontech).

1.2.1.1.3 Amplification of RGS14₄₁₄ gene

Prior to PCR, a restriction sites analysis of RGS14₄₁₄ gene was carried out by NEBcutter version 2.0 (New England Biolabs). Considering that both XhoI and EcoRI restriction sites (New England Biolabs, R0101S and R0146S) of MCS of pLVX-DsRed-Monomer-C1 (figure 8) were absent in RGS gene, both were selected for cohesive end gene insertion.

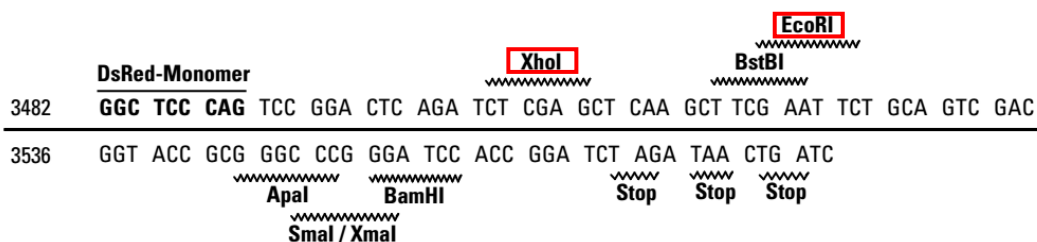


Figure 8. Multiple cloning site of pLVX-DsRed-Monomer-C1. XhoI and EcoRI endonucleases (both in frames) were selected to clone RGS14₄₁₄ (image taken from Clontech).

A PCR was performed to include XhoI and EcoRI restriction sequences at 5' and 3' ends, respectively. Both forward (M103-XhoI), and reverse (M104-EcoRI) primers used in this reaction are shown in table 1 and were synthesized by Sigma Aldrich company. In addition to restriction sequence in forward primer, Shine-Dalgarne sequence (a ribosomal binding site in prokaryotic mRNA to initiate protein synthesis in prokaryotes) and Kozak sequence (a consensus sequence of eukaryotic mRNA necessary to initiate the translation process) were added to promote efficient protein synthesis of RGS gene.

Table 1. Primers to add XhoI and EcoRI restriction sites in RGS14₄₁₄.

PRIMER	SEQUENCE (5'→3')
M103-XhoI	TACTC*TCGAGGAAGGAGATAGAACCATTGGATTTCGGGCACAGCAGCTTCAGATC ***** XhoI
M104-EcoRI	ACACG*AATTCGAG GGC TGA GTC GGT GGT GGA ***** EcoRI

*: shows the cleavage points of both endonucleases Xho and EcoRI target sequence. Shine Dalgarne sequence is indicated in red and Kozak sequence in green. The two underlined nucleotides were added to keep the open reading frame.

The PCR was carried out using reagents from Promega (table 2) in *Sprint* thermocycler (Thermo Electro Corporation) as shown in table 3.

Table 2. PCR reaction.

REAGENT	VOLUME	FINAL CONCENTRATION
5X Colorless Go Taq® Flexi Buffer Mg free (Promega, M890A)	10 µl	1X
MgCl₂ (25 mM) (Promega, A351B)	2 µl	1 mM
PCR Nucleotide Mix (1.25 mM) * (Promega)	5 µl	125 µM (each nucleotide)
M103-XhoI primer, 10µM (Forward) (Sigma-Aldrich)	2 µl	0.4 µM
M104-EcoRI primer, 10µM (Revers) (Sigma-Aldrich)	2 µl	0.4 µM
RGS14₄₁₄ cDNA (560 ng/µl)	0.5 µl	280 ng
GoTaq® g2 Flexi DNA polymerase (5 U/µl) (Promega, M780A)	0.5 µl	2.5 U
Nuclease-Free Water (Gibco, 10977)	28 µl	n/a
Total volume	50 µl	

* A 1,25 mM stock of triphosphate deoxynucleotides (dNTPs) was made from dATP (Promega, U120B), dGTP (Promega, U121B), dCTP (Promega, U122B) and dTTP (Promega,U123B) with an initial concentration of 100 mM each nucleotide.

Table 3. Amplification cycles and temperatures.

STEP		TEMPERATURE	TIME
Initial denaturation		95 °C	3 min
30 cycles	Denaturation	95 °C	1 min
	Annealing	57 °C	1 min
	Extension	72 °C	3 min
Hold		4 °C	--

1.2.1.1.4 Gel purification of PCR product

The PCR product from above was purified by 1% agarose gel electrophoresis (appendix 1.a.2). Samples mixed with 30 % glycerol in proportion 4:1 were loaded on gel, and separated with Tris-Boric acid-EDTA (TBE) buffer (appendix 1.a.1) by applying 100 V power (Power-Pac 300, Bio-Rad). The DNA band was visualized under a long-wavelength UV light (Bio-Rad equipment *Gel Doc 2000*) and was excised using a sterile scalpel (figure 9) and transferred to a previously weighted 1.5 ml tube. The weight of the excised band was 350 mg.

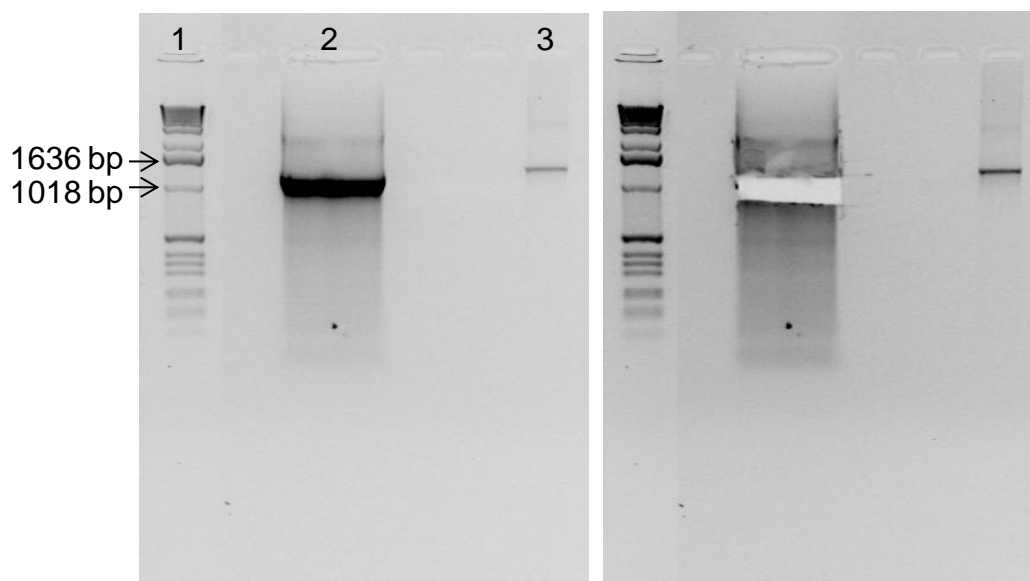


Figure 9. Electrophoresis of RGS14 DNA with restriction sites for Xho I and EcoRI to purify. The gel on the right shows the band cut. (1) Molecular weight ladder, (2) RGS14₄₁₄ cDNA with endonuclease target sequence resulting from PCR (1283 bp) and (3) RGS14₄₁₄ cDNA used as PCR template (1245 bp).

RGS DNA purification from excised gel was carried out following manufacture's protocol of *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit* (Promega, A9281) with some modifications (appendix 1.c.2). Recovered DNA solution (about 40 µl) with a final concentration of 55.63 ng/µl was stored at -20 °C.

1.2.1.1.5 Restriction reaction

Compatible cohesive ends between RGS14₄₁₄ gene and pLVX-DsRed-Monomer-C1 were generated by XhoI and EcoRI endonuclease enzymes reaction as is shown in table 4. The reaction was carried out at 37 °C in a thermostatic bath (SW22, Julabo) for 16 h in case of RGS14₄₁₄ gene and 4 h in case of vector. The endonucleases were inactivated by heating at 65 °C in a dry block thermostat (Bio TDB-100, Boeco) for 20 min.

Table 4. Restriction reaction of RGS14₄₁₄ and pLVX lentiviral vector.

REAGENT	VOLUME	
	RGS14 ₄₁₄ GENE (55.63 ng/μl)	pLVX PLASMID (0.5 μg/μl)
cDNA	18 μl (1 μg)	1 μl (0.5 μg)
XhoI (20000 U/ml)	1.5 μl (30 U/μg DNA)	0.25 μl (10 U/μg DNA)
EcoRI (20000 U/ml)	1.5 μl (30 U/μg DNA)	0.25 μl (10 U/μg DNA)
NEBuffer 2.1(10X) (New England Biolabs, B7202S)	5 μl	2.5 μl
Nuclease-Free Water (Gibco,10977)	24 μl	25 μl
Total volume	50 μl	25 μl

The DNAs resulting from restriction reactions were purified using agarose gel (figure 10) as explained in previous section (section III.1.2.1.1.4) and their concentrations were determined by absorbance at 260/280 nm. The final concentration was 6.06 ng/μl in both cases.

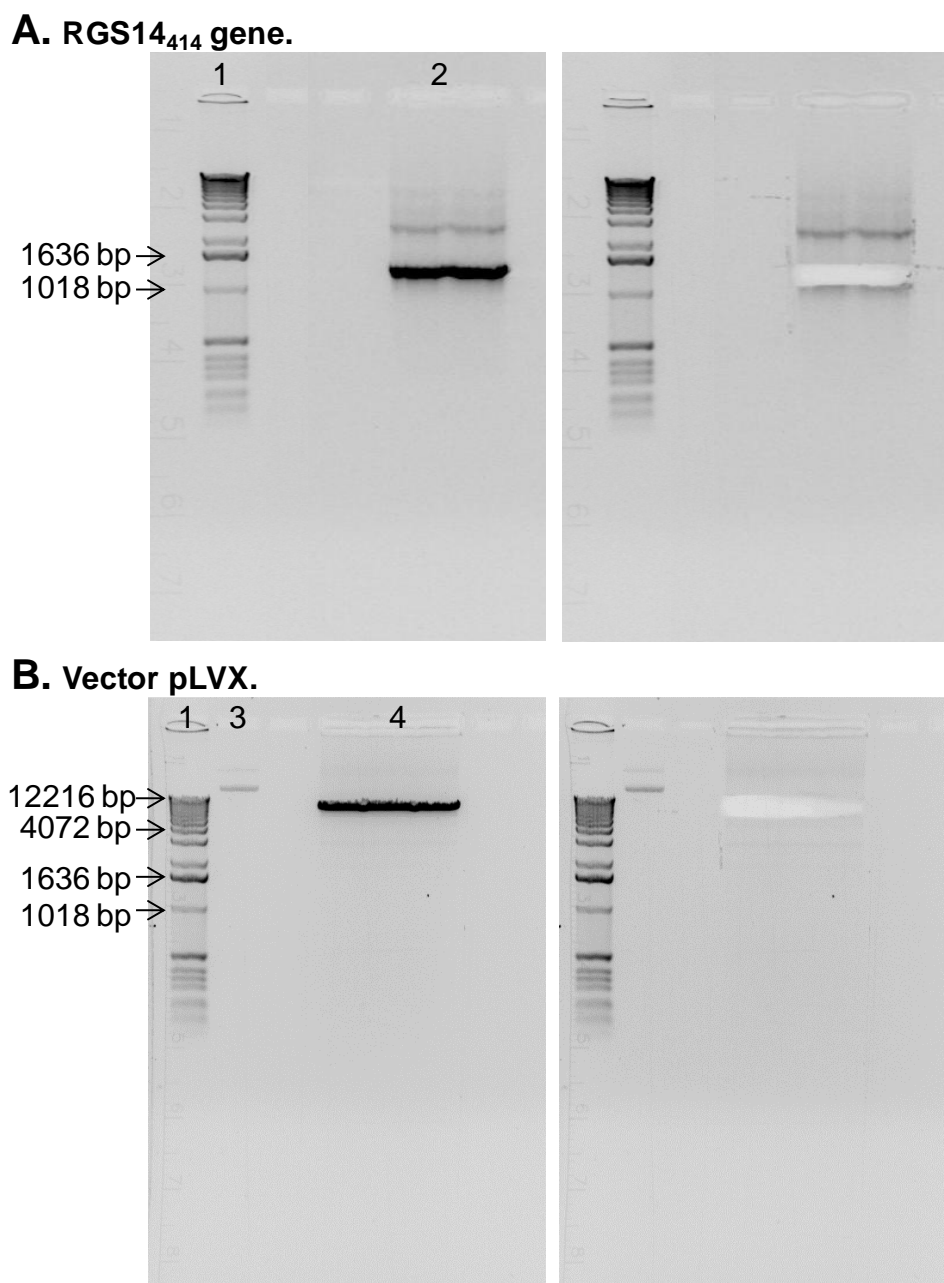


Figure 10. Electrophoresis for gel purification of resulting product from restriction reactions. Electrophoresis of the RGS14 (A) and plasmid pLVX (B) cDNAs cut with XhoI and EcoRI. The gels on the right show the bands cut. (1) Molecular weight ladder, (2) RGS14₄₁₄ cDNA (1283 bp) restriction reaction, (3) pLVX cDNA without endonuclease cutting and (4) pLVX vector resulting from restriction reaction.

1.2.1.1.6 Ligation reaction

To insert gene into the vector, a ligation reaction using the T4 DNA ligase (Life Technologies, 15224) was performed as is detailed in table 5. All the reagents, excluding the T4 ligase enzyme, were mixed previously and incubated at 45 °C in the dry block thermostat (Bio TDB-100, Boeco) for 5 min to prevent non-specific binding between cohesive ends.

After addition of ligase enzyme, the reaction was performed at 24 °C for 1 hour. At the end of reaction, ligase enzyme was inactivated by incubation at 70 °C for 10 min.

Table 5. Ligation reaction.

REAGENT	VOLUME
5X reaction buffer (Life technologies, 46300-18)	4 µl
RGS14₄₁₄ cDNA (6.06 ng/µl)	9.9 µl (60 ng)
pLVX vector cDNA (6.06 ng/µl)	3.3 µl (20 ng)
T4-Ligase (1 U/µl) (Life technologies, 15224)	1 µl
Nuclease-Free Water	1.8 µl
Total volume	20 µl

1.2.1.1.7 Transformation into *E. coli*

With the goal to amplify, samples after ligation containing RGS14₄₁₄ recombinant DNA were transformed into *One Shot® Omni Max™ 2 T1® Chemically Competent E.coli* (Life Technologies, C8540-03) by heat shock according to the manufacturer's protocol (appendix 1.b.2). Finally, among the grown colonies, four (Col. 1-4) were selected for the test.

1.2.1.1.8 Extraction and purification of recombinant DNA

To evaluate the correct insertion of the gene, each colony was inoculated in 2 ml of LB liquid medium with 100 µg/ml ampicillin (appendix 1.b.1) for 16 h at 37 °C while shaking at 225 rpm in an orbital shaker incubator (Optic Ivymen System). An aliquot of each bacterial culture was spread on 90 mm diameter Petri plates of LB-agar with ampicillin (appendix 1.b.1). The plates were incubated for 24 h at 37 °C and stored at 4 °C as stock for future maxiprep preparations.

1.2.1.1.8.1 Miniprep

The ampicillin resistant colonies were processed to extract and purify recombinant DNA by using *StrataPrep plasmid miniprep kit* (Agilent technologies, 400761), following manufacturer's protocol with some modifications (appendix 1.c.3). To test gene insert size in all 4 colonies, restriction reactions with XhoI and EcoRI enzymes were performed in each

eluted recombinant DNA (table 6). The restriction reactions took place for 16 h at 37 °C. Then, 15 U of each enzyme was added and reincubated at 37 °C for additional 2 h. Finally, the reaction was stopped by heating at 65 °C for 20 min.

Table 6. Restriction reaction with XhoI and EcoRI endonucleases of DNA from miniprep.

REAGENT	VOLUME (For each colony)
Purified DNA (miniprep)	5 µl
XhoI (20000 U/ml)	1.5 µl (30 U/µg DNA)
EcoRI (20000 U/ml)	1.5 µl (30 U/µg DNA)
NEBuffer 2.1(10X) (New England Biolabs, B7202S)	2 µl
Nuclease-Free Water	10 µl
Total volume	20 µl

The restriction products were loaded in a 1% agarose gel to visualize the result similar to as described in previous section. As shown in figure 11, colonies 2 and 3 presented two main bands of 8.8 and 1.28 kb, which corresponds to the vector pLVX and the RGS14₄₁₄ gene, respectively. These results indicate that at least, colonies 2 and 3 retain the characteristics of vector as well as of RGS gene insert. For our future experiments, colony 2 was selected to proceed with the maxiprep and obtain a bigger amount of RGS14₄₁₄ recombinant DNA.

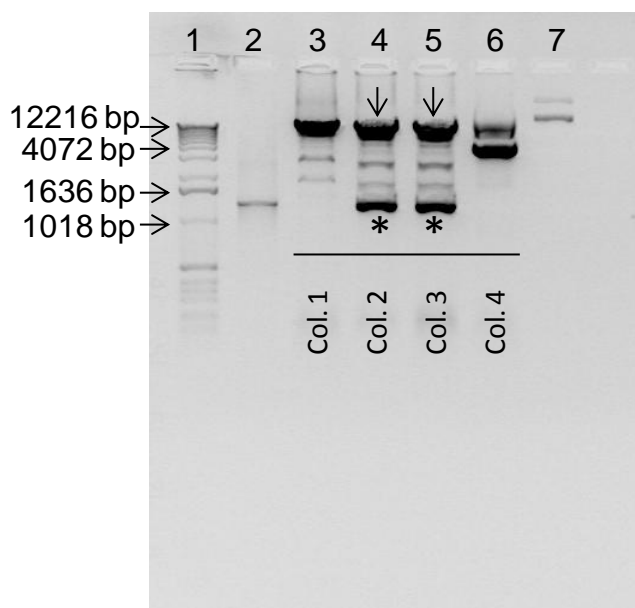


Figure 11. XhoI and EcoRI restriction reaction of DNA resulting of miniprep to prove the presence of RGS14₄₁₄ recombinant DNA. Restriction reaction of miniprep from colonies 1-4, demonstrated that only, colonies 2 and 3 had included RGS14₄₁₄ recombinant. Thus, the restriction reaction generated two main bands of 8.8 and 1.28 Kb which corresponds to the vector pLVX and the RGS14₄₁₄ gene respectively. Colonies 1 and 4 only had included the vector without the insert. Arrows indicate the vector pLVX and asterisks the RGS14₄₁₄ gene. Numbers 1, 2 and 7 indicate the molecular weight ladder, RGS14₄₁₄ as positive control and pLVX vector without endonuclease cutting respectively.

1.2.1.1.8.2 Maxiprep

Stored stock of bacteria of colony 2 was inoculated in 5 ml of LB liquid medium with 100 µg/ml ampicillin for 8 h at 37 °C with shaking at 225 rpm and then, this culture was added into a flask containing 300 ml of LB medium with ampicillin and further incubated at 37 °C, 225 rpm for 15 h. A stock of bacteria with RGS14₄₁₄ recombinant DNA was prepared at this stage and stored at -80 °C for long-term use.

Maxiprep was done by using *Wizard® Plus Maxiprep DNA Purification System kit* (Promega, A7270), following the manufacturer's protocol (appendix 1.c.4). After maxiprep, resultant RGS14₄₁₄ recombinant DNA concentration was 635 ng/µl. The DNA was aliquoted in 20 µl in DNase free tubes and stored at -80 °C until their use. The integrity of RGS gene insert into vector was further examined by XhoI and EcoRI restriction reaction as described in table 7 and additionally by DNA sequencing at the Genomics Unit of the Scientific Park of Madrid. It was confirmed thus that the whole sequence was intact and showed no mutation.

Table 7. Restriction reaction with XhoI and EcoRI endonucleases of DNA from maxiprep.

REAGENT	VOLUME
Purified DNA (maxiprep)	0.8 µl (500 ng)
XhoI (20000 U/ml)	0.75 µl (30 U/µg DNA)
EcoRI (20000 U/ml)	0.75 µl (30 U/µg DNA)
NEBuffer 2.1(10X)	2 µl
Nuclease-Free Water	15.7 µl
Total volume	20 µl

The restriction reactions took place for 4 h at 37 °C. Then, the reaction was stopped by heating at 65 °C for 20 min. The restriction products were loaded in a 1 % agarose gel to visualize the result similar to as described in previous section (figure 12).

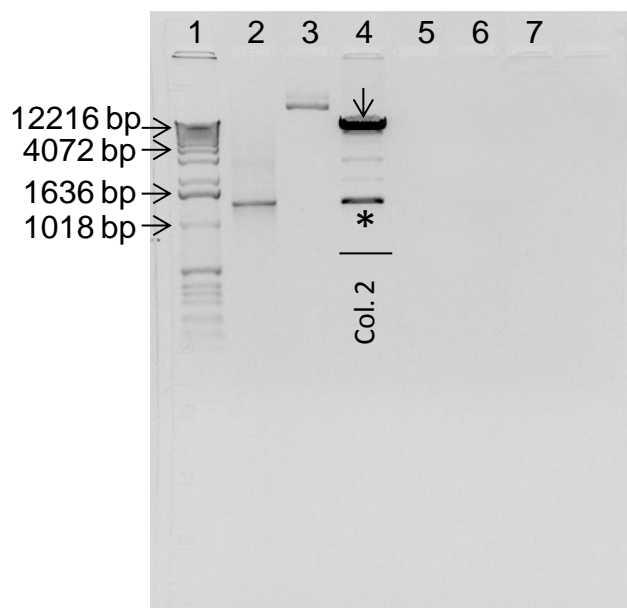


Figure 12. XhoI and EcoRI restriction reaction of DNA resulting of maxiprep from colony 2. It was confirmed that the colony 2 was correctly transformed with the RGS14₄₁₄ recombinant DNA since it presents the vector pLVX band (8.8 Kb, indicated by an arrow) and the RGS14₄₁₄ gene band (1.28 Kb, indicated by an asterisk). Numbers 1, 2 and 3 indicate the molecular weight ladder, RGS14₄₁₄ as positive control and pLVX vector without endonuclease cutting respectively.

1.2.1.2 Lentivirus production and titration

1.2.1.2.1 Cell lines

(i) The lentivirus stock was produced in the 293T cell line (Clontech, 632180), a subclone of the transformed human embryonic kidney cell line, HEK 293, with type-5 human adenovirus. These eukaryotic cells are highly transfectable and supports high levels of lentiviral protein expression (Pear et al 1993) and expresses the SV40 large T antigen under control of the constitutively active human *citomegalovirus* (CMV) promoter. Table 8 indicates the composition of complete growth medium of this cell line.

Table 8. Complete growth medium for the 293T cell line.

REAGENT		VOLUME
Base growth medium		450 ml
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, 52100-021)	6.69 g	
Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, S5761)	1.85 g	
Non-Essential Amino Acids100X (Gibco, 11140-050)	5 ml	
L-glutamine 200mM (Gibco, 25030-032)	5 ml	
Sodium pyruvate 100mM (Gibco,11360-070)	5 ml	
Milli-Q water	485 ml	
Total	500 ml	
Fetal Bovine Serum (Tet System Approved) (Clontech, 631105)		50 ml
Penicillin-streptomycin (Gibco, 15140-122)		5 ml

*In appendix 2 are detailed the protocols of cells freezing and thaw, as well as the subculture procedure. These cells require a specific pretreatment of the culture surface (appendix 2.a).

(ii) The lentivirus titer was determined using HT1080 cells (ATCC, CCL-121), a cell line derived from fibrosarcoma human cell line. Table 9 indicates the composition of the complete culture medium of this cell line.

Table 9. Complete growth medium for the HT1080 cell line.

REAGENT		VOLUME
Base growth medium		450 ml
Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco, 41500-018)	4.81 g	
Sodium bicarbonate	0.75 g	
Sodium pyruvate 100mM (Gibco, 11360-070)	5 ml	
Milli-Q water	495 ml	
Total	500 ml	
Fetal Bovine Serum (Gibco, 10500-064)		50 ml
Penicillin-streptomycin		5 ml

*In appendix 2 are detailed the protocols of cells freezing and thaw, as well as the subculture procedure.

1.2.1.2.2 Transfection, production and concentration of lentivirus

1.2.1.2.2.1 Transfection and production

The lentivirus production started with the transfection of the 293T cells with the RGS14₄₁₄ recombinant DNA by using *Lenti-XTM Packaging System* (Clontech, 631247) according to the manufacturer's protocol (appendix 2.d). All steps were carried out according to Biosafety level 2 instructions (Chosewood et al 2009).

This transfection took place at the seventh subculture of this cell line in 100 mm Petri plates (Corning, 734-1815). 4.5×10^6 cells per plate were seeded in six plates containing 10 ml of complete medium but without antibiotic. After 72 h, lentiviral supernatants were harvested and pooled in *Ultra-Clear* tubes (Beckman Coulter, 344058) for the next step of concentration.

1.2.1.2.2.2 Lentivirus concentration

To concentrate, lentiviral solutions were ultracentrifuged (Ichim & Wells 2011; Reiser 2000) at 25.000 rpm, 4 °C for 90 min using Beckman XL-90 ultracentrifuge and SW29 rotor. Supernatants were discarded and 150 µl of sterile saline serum was added to pellet and

placed at 4 °C for overnight to facilitate the resuspension of lentivirus. Aliquots of 3 µl were prepared and stored at -80 °C.

For the production of a vehicle-lentivirus stock, the same procedure described before (transfection, production and concentration) was followed using the empty vector in this case.

1.2.1.2.3 Lentivirus titration

The lentivirus infection was done in HT1080 cells. After fourth subculture of HT1080 cells, 2×10^5 cells were seeded in 2 ml per well of a 6-well plate (Nunc, 140675) and were incubated in CO₂ incubator for 24 h. For infection of HT1080 cells with concentrated lentivirus, 10x serial dilutions ranging from 10^{-3} to 10^{-7} were prepared in 1 ml and they were added in each well of 6-well plate together with one well as mock control where lentivirus was replaced by complete medium. Cells were incubated in CO₂ incubator for 48 h.

For the selection of transfected cells, culture medium from 6-well plate was removed and replaced by 2 ml of complete HT1080 growth medium with 1 µg/µl puromycin (Clontech, 631306). Since vector pLVX contains Puro^r gene, transfected cells expressing this gene are expected to show resistance against this drug. In continuation, cells were incubated in this drug for 10 days with change of culture medium every two days. Survived cell colonies were stained in crystal violet solution (appendix 2.e). The titer in terms of colony forming units (CFU) of lentivirus stock was estimated by calculating mean of the number of colonies generated by two least concentrated dilutions, multiplied by the dilution factor. As shown in figure 13, RGS14₄₁₄-lentivirus titer was 1.75×10^7 CFU/ml and vehicle-lentivirus titer was 2.75×10^6 CFU/ml.

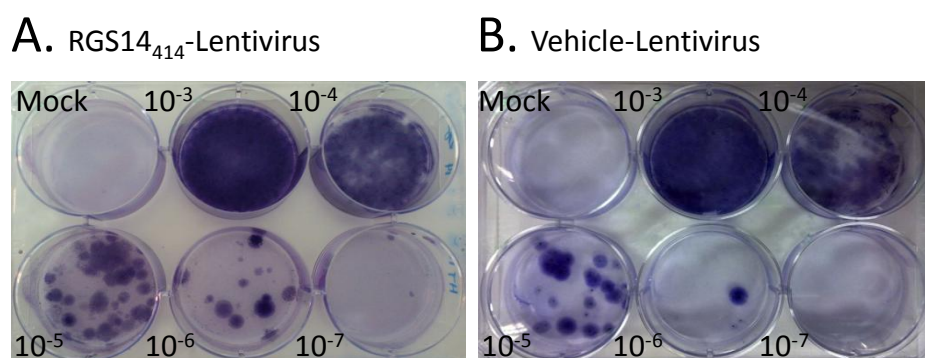


Figure 13. Titration of lentivirus stocks. (A) RGS14₄₁₄-lentivirus. (B) Vehicle-lentivirus.

1.2.2 Animal housing conditions and stereotaxic surgery

1.2.2.1 Housing conditions

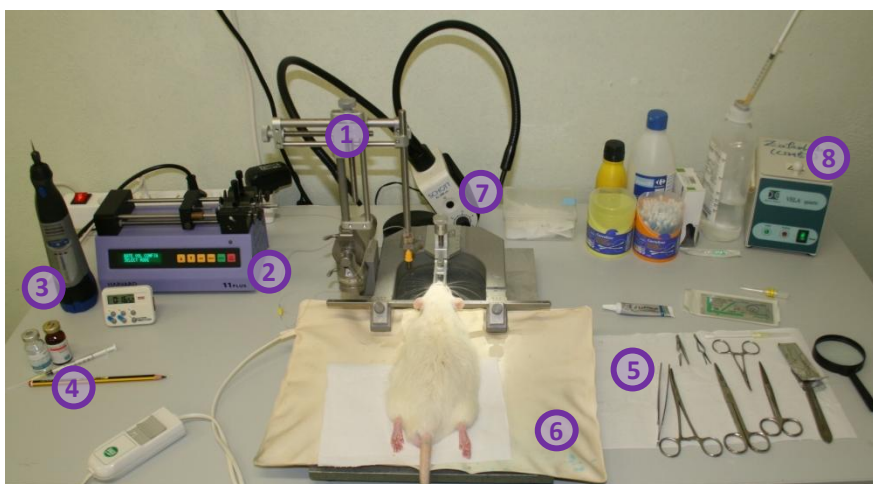
Animals were housed individually in eurostandard cage with free access to food and water. Animals were housed in a temperature-controlled (20 ± 2 °C) room on a 12 h light/dark cycle. All experimental procedures in animals were carried out in accordance with European and Spanish regulations (2010/63/EU, and RD53/2013). Research study performed in this thesis was approved by Committee of Ethics on Animals Use of University of Malaga.

1.2.2.2 Stereotaxic surgery

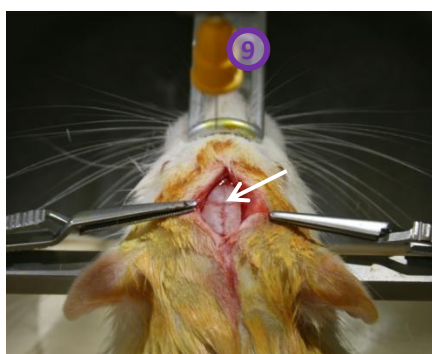
1.2.2.2.1 Surgical procedure

Before proceeding, animals were deeply anesthetized by administering intraperitoneally 75 mg/kg ketamine (Imalgene 1000; Merial Laboratorios) and 1 mg/kg (rats) or 0.5 mg/Kg (mice) of medetomidine (Domtor, Pfizer). During surgery, animal body temperature was maintained with an electric blanket. Animals head was placed on the stereotaxic apparatus (Stoelting). For the surgery of mice, an adaptor (Cunningham mouse, Harvard Apparatus) was coupled (Cetin et al 2006). The injection was carried out by a 30 G dental carpule (Heraeus Kulzer Iberia) connected to a 10 ml Hamilton syringe (Microliter™ #701, Harvard Apparatus) through a plastic tube connector. Lentivirus was infused at the rate of 10 μ l/h using an infusion pump (11 Plus, Harvard Apparatus) (figure 14). The carpule was maintained into the brain area for five more minutes once the lentivirus injection was finished to facilitate complete diffusion. Unilateral injections of 2 μ l (rats) or 1 μ l (mice) of RGS-lentivirus or vehicle-lentivirus were delivered in the right hemisphere.

A



B



C

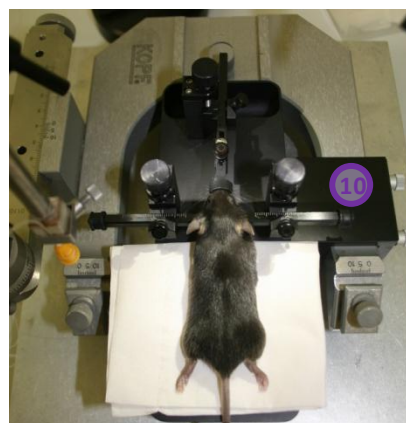


Figure 14. Illustration of the experimental setup for intracranial lentivirus microinjection in rodents. (A). A picture representing a rat placed in the stereotaxic frame. **(B).** A picture showing the bregma position (indicated by an arrow) in the rat skull. **(C).** A picture representing a mouse placed in the stereotaxic frame. **1:** stereotaxic apparatus; **2:** infusion system; **3:** drill; **4:** anesthesia; **5:** surgical instruments; **6:** electric blanket; **7:** cold light; **8:** dry heat sterilizer; **9:** dental carapule; **10:** mouse stereotaxic adaptor.

1.2.2.2.2 Coordinates of injection

The coordinates for injection were taken from “*The Mouse Brain in Steriotaxic Coordinates*” (Paxinos & Franklin 2001) and “*The Rat Brain in Steriotaxic Coordinates*” (Paxinos & Watson 1998) (table 10).

Table 10. Rodent injection coordinates for area V2.

RODENT	COORDINATES		
	Anteroposterior (AP)*	Mediolateral (ML)*	Dorsoventral (DV)**
MOUSE	-2.3	± 1.3	-0.7
RAT	-4.3	± 2.1	-1.9

*(AP) and (ML) obtained from bregma

** (DV) obtained from duramater

1.2.2.2.3 Post-surgical care and recovery

After stereotaxic surgery, animals were treated daily for 5 days with local antibiotic (Dermocan, Fatro) application on the incision, 150 μ l intraperitoneal injection of meloxicam analgesic (Metacam 5 mg/ml, boehringer Ingelheim) and 300 μ l buprenorphine analgesic (Buprex 0.3 mg/ml, RB Pharmaceuticals) administered through 300 ml of the drinking water. After 21 days of injection and total recovery from the surgery, behavioral tests were performed in these animals.

1.2.3 Confirmation of RGS14₄₁₄ protein expression by immunohistochemistry

The expression of RGS14₄₁₄ was confirmed by immunohistochemistry using a specific antibody (figure 15). This was performed similar to as described previously (Lopez-Aranda et al 2009). Details of the procedure are details in appendix 4.

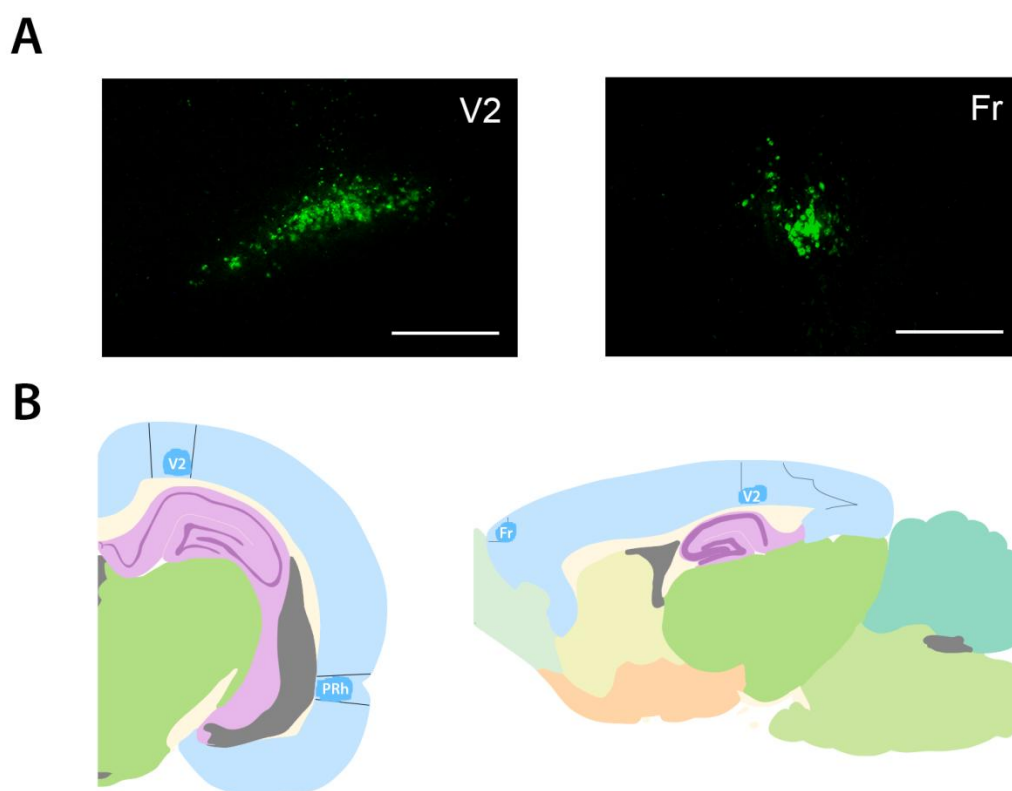


Figure 15. Confirmation of RGS14 protein expression in RGS14-treated rats. (A). Representative image illustrating expression of RGS14 by fluorescent immunohistochemistry in coronal brain sections of area V2 (V2) and of frontal cortex (Fr). Bars represent 200 μ m. (B). Schematic drawing representation of coronal (left) and sagittal (right) sections indicating the localization of RGS14 protein (blue) at the injection sites. The brain areas of V2, Fr and perirhinal (PRh) are delimited by thin lines within the cerebral cortex.

1.2.4 ORM test

ORM test was used in our experiments to evaluate status of object recognition memory in both rodent models. This test is based on spontaneous exploration and discrimination between novel and familiar objects (Ennaceur & Delacour 1988). This test was performed in daylight and was reliant on visual as well as other tactile cues, including vibrissae.

1.2.4.1 ORM test in rat

The protocol used for this study has been described previously (Lopez-Aranda et al 2009) and consists of three phases:

- (i) Handling phase. Rats were handled for 8 min during 5 consecutive days. This process included placing animals on arm, gently caressing on head and body with fingers, and moving up and down every 2 or 3 min by holding the whole body (simulating the animal placing in the open field during the next phases).
- (ii) Habituation phase. Rats were habituated with open field box, a black home-made square of 100 x 100 x 50 cm, where ORM test was going to take place. They were allowed to freely explore open field for 12 min daily for 3 consecutive days. These sessions are done in order to make the animal became familiar with the open field as well as the room where the animal will perform the next phase.
- (iii) Test phase. It was performed in two steps as described below (figure 16):

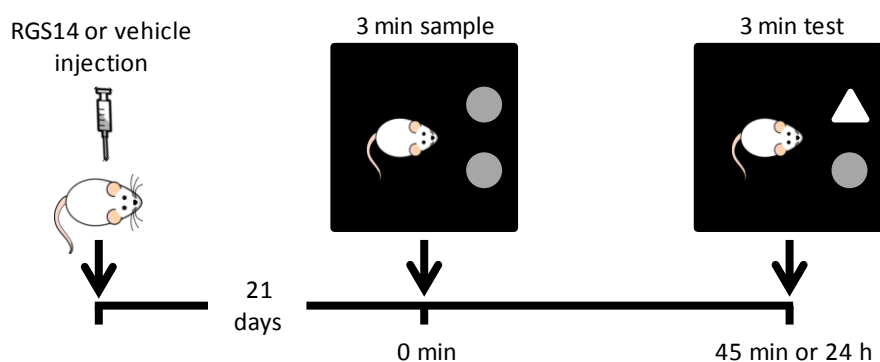


Figure 16. Object recognition memory test in rats.

- a) Exposure to objects: Two identical objects were placed at 30 cm distance from walls of open field box and animals were released into the box facing their nose

towards the wall and opposite to the objects. They were allowed to explore the objects for 3 min.

b) Discrimination of objects: After a delay of 45 min or 24 h, rats were exposed to one familiar object (from above) and a novel object for 3 min.

1.2.4.2 ORM test in mouse

We have followed the protocol for this work that has been done previously (Escribano et al 2009; Schiapparelli et al 2006) and consists of three phases:

- (i) Handling phase. It is similar to described before for rats except that the positioning of the animal in this case was on the investigator hand instead of the arm.
- (ii) Habituation phase. Mice were allowed to freely explore a green open field (50 x 35 x 50 cm; Harvard Apparatus) for 10 min daily for 2 consecutive days.
- (iii) Test phase. Similar to rats, this phase was done in two steps (figure 17):

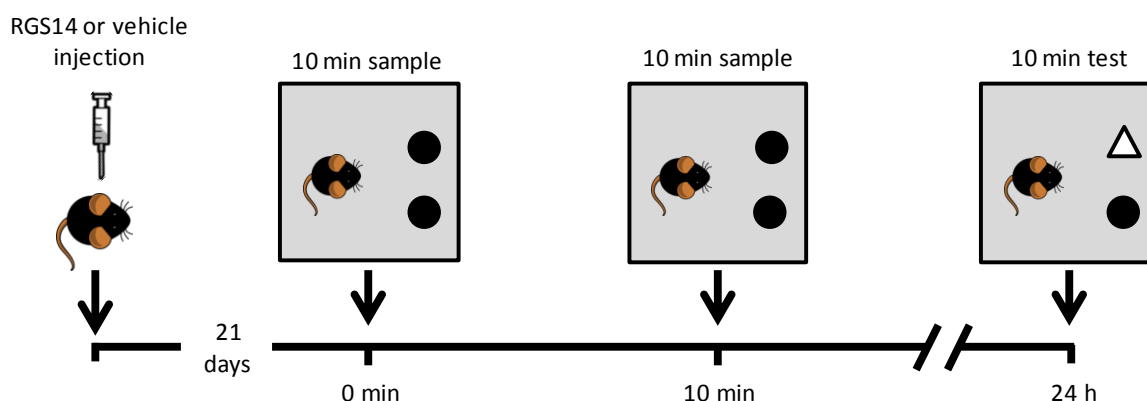


Figure 17. Object recognition memory test in mice.

- a) Exposure to objects. Two acquisition sessions of 10 min were done with 10 min apart. During each session, animals were allowed to explore two identical objects.
- b) Discrimination of objects. After a delay of 24 h, mice were exposed for 10 min to one familiar object and a novel object.

Objects included in this test (appendix 3 (a and b)) showed no difference in object preference test. In addition, novel and familiar objects were randomly placed on both sides to eliminate

possible place preference. Open field box and objects were cleaned with 70 % (v/v) ethanol between each animal to eliminate interfering odor trails (Antunes & Biala 2012).

1.2.4.3 Data collection

Both steps of the test phase were recorded with video camera and later were analyzed by investigators without any knowledge of which animal belongs to which group. Exploration time was computed by using the criteria of duration when animal touches the object with nose. With the data on time spent in exploration of each object, discrimination index (DI) was calculated as following, where N is exploration time of novel object and F is exploration time of familiar object:

$$DI = N / (N + F)$$

DI value of 0.5 reflects equal exploration time of both familiar and novel objects and further suggests that animals were unable to keep the object information in memory. However a DI value above 0.66 was considered that animals could retain the information in memory after a delay period.

1.2.4.4 Statistical analysis

DI values were presented as mean \pm SEM and an unpaired Student's t-test (comparison of two groups) or a one-way ANOVA (comparison of 3 or more groups) followed by the appropriate *post hoc* test (Tukey's *post hoc* test for pairwise comparison or Bonferroni's *post hoc* test for comparisons versus a control group) were run in the software SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific) to detect significant differences inter or intra-group accepting a 5 % error probability ($p \leq 0.05$).

2 Second block of experiments: Identify pathways implicated in RGS14₄₁₄-mediated memory enhancement

2.1 Experimental design

Mechanisms that underlie RGS14₄₁₄-mediated memory enhancement were investigated here by monitoring the effect of different agonists and inhibitors on performance of RGS-animals in ORM test (section III.1.2.4). First, memory enhancer effect of RGS14₄₁₄

was confirmed and then, same RGS-animals were administered with drugs (antagonists or inhibitors) that are linked to memory processing pathways. A brief description of experimental design is presented in figure 18.

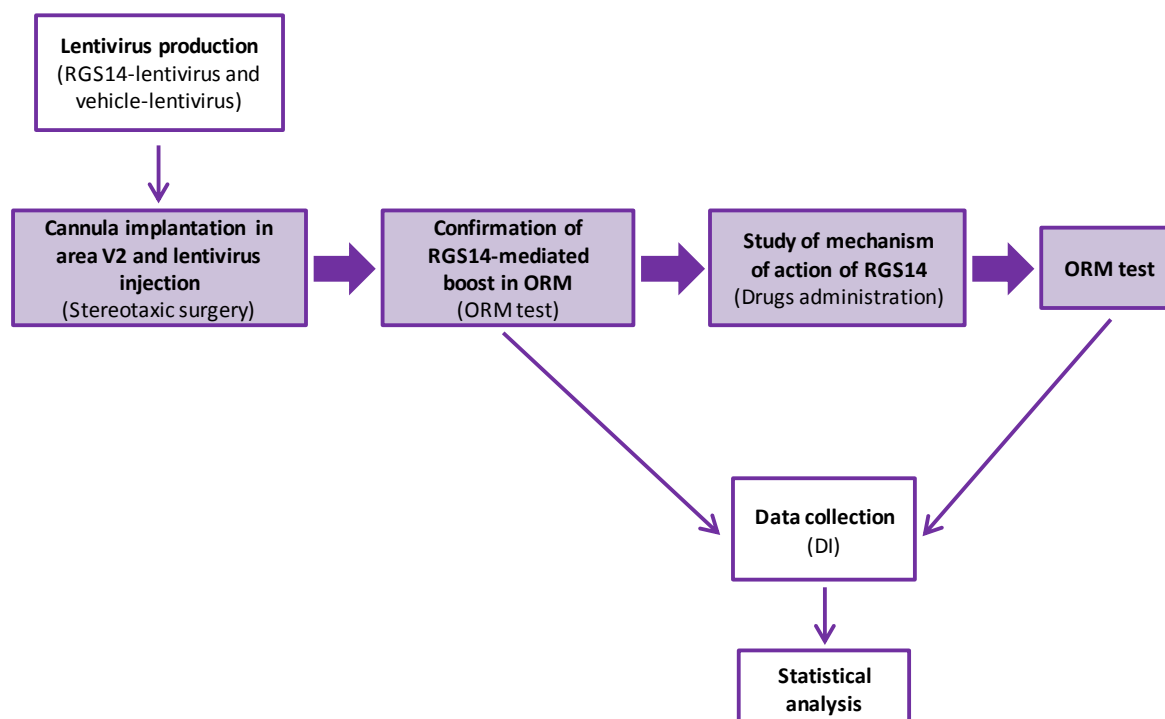


Figure 18. A scheme of experimental design.

Two sets of 7 male Wistar Han rats between 3-4 months of age were used for initial ORM test where one set was treated in area V2 with RGS14₄₁₄-lentivirus (RGS14 group) and other was treated with vehicle-lentivirus (vehicle group) (sections III.1.2.1 and III.1.2.2.2). For drug administration, 39 animals were used. In these animals, a cannula was implanted in area V2 (section III.2.2.1) to inject lentivirus as above and later, it was used to administer drugs during studies. Drugs injection time frames and volumes are described in detail in table 11.

Table 11. Antagonists and inhibitors used in the pharmacological studies.

DRUG	MECHANISM OF ACTION	MOMENT OF ADMINISTRATION (with reference to the ORM-test)	ADMINISTRATED VOLUME	REFERENCE
CNQX (Ascent, Asc-044)	Potent, competitive AMPA / kainate receptor antagonist. Also antagonist at NMDA receptor glycine site	15 min before exposure to objects	1 μ l at a concentration of 1.76 μ g/ μ l in 0.9 % physiological saline	(Winters & Bussey 2005)
DL-AP5 (Ascent, Asc-271)	NMDA receptor antagonist	15 min before exposure to objects	2 μ l at a concentration of 7 μ g/ μ l in 0.9 % physiological saline	(Winters & Bussey 2005)
LY367385 (Sigma-Aldrich, L4420)	Selective metabotropic glutamate 1a receptor (mGluR1a) antagonist	20 min before exposure to objects	1 μ l at a concentration of 2 μ g/ μ l in 0.9 % physiological saline	(Nae & Manahan-Vaughan 2005; Simonyi et al 2007)
KN-62 (Ascent, Asc-271)	Ca ²⁺ / calmodulin - dependent protein kinase II (CaMKII) inhibitor	10 min before exposure to objects	2 μ l at a concentration of 35 ng/ μ l in 2 % DMSO in 0.9% physiological saline	(Tinsley et al 2009)
U0126 (Ascent, Asc-241)	Selective non-competitive inhibitor of MAP kinase kinase (MKK)	30 min before exposure to objects	0.5 μ l at a concentration of 2 μ g/ μ l in 50 % DMSO	(Apergis-Schoute et al 2005)
ZIP (Tocris, 2549)	Inhibitor of protein kinase M ζ (PKM ζ)	24 h before exposure to objects	2 μ l at a concentration of 30 nmol/ μ l in PBS+0.1 M of acetic acid	(Li et al 2011)
TIQ-A (Sigma, T2825)	Poly[ADP]-ribose polymerase 1 (PARP-1) inhibitor (ribosylation inhibition)	5 min before exposure to objects	1 μ l in 100 % DMSO in physiological saline at a final concentration of 300 nM	(Fontan-Lozano et al 2010)

2.2 Methods

Note: The methodological procedure for this block concerning lentivirus production and ORM test is detailed in the sections III.1.2.1 and III.1.2.4 respectively.

2.2.1 Cannula implantation and lentivirus injection

Before proceeding, rats were deeply anesthetized by administering intraperitoneally 75 mg/kg ketamine (Imalgene 1000; Merial Laboratorios) and 1 mg/kg medetomidine (Domtor, Pfizer) and fixed in a stereotaxic apparatus (Stoelting) (Cetin et al 2006). For these studies where the administration of different drugs is necessary, a guide cannula (Plastics one, C317G) was chronically implanted into area V2 of the right hemisphere (see coordinates in section III.1.2.2.2.2). This cannula was fixed to the rat skull with three screws (Plastics one, 0-80X1-8) and Resirapid acrylic cement (Garcia y Brückner). A dummy cannula (Plastics one, C317DC) was inserted to prevent clogging of the guide cannula. The next day of cannula implantation and after anesthetizing the rats once again, 2 μ l of lentivirus (RGS14 or vehicle) were infused at the rate of 10 μ l/h using an injection cannula (Plastics one, C317I) which was inserted in the guide cannula (figure 19) and connected to a 10 ml Hamilton syringe (MicroliterTM #701, Harvard Apparatus) through a plastic tube connector and in turn to an infusion pump (11 Plus, Harvard Apparatus).

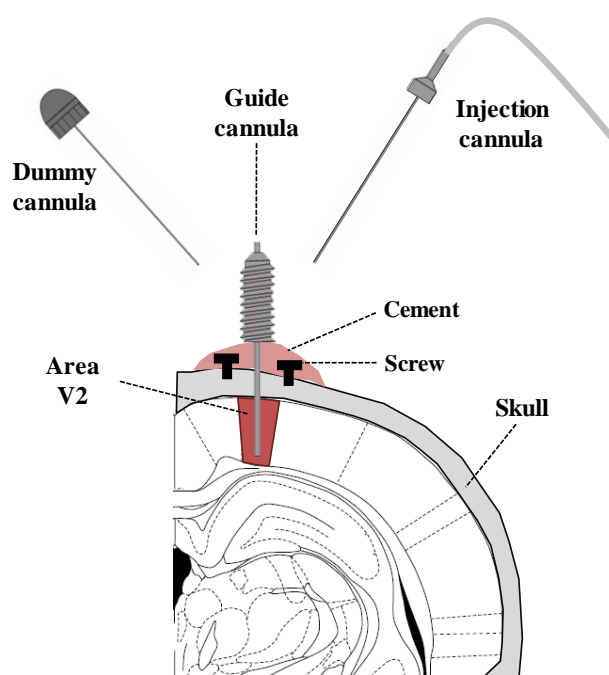


Figure 19. Schematic representation of the cannula system for unilateral microinjections into area V2. The guide cannula was inserted into the brain and fixed to the rat skull with acrylic cement and stainless steel screws. The dummy cannula and the injection cannula are also shown.

21 days after the injection of lentivirus, the different drugs were administrated using the injection cannula. All studies were performed in awake and unstressed rats.

Animals were housed in the same conditions as in the first block of experiments (section III.1.2.2) with the appropriate post-surgery recovery (section III.1.2.2.3). Behavioral studies were performed and analyzed as describe previously (section III.1.2.4), with the exception of the cannula insertion simulation based in the dummy cannula insertion and removal three o for times.

3 Third block of experiments: Determine relationship between memory enhancer effect of RGS14₄₁₄ and AMPA receptors

3.1 Experimental design

Taking into consideration the implication of AMPA receptors in episodic memory processing (Griffiths et al 2008; Malkova et al 2015; Winters & Bussey 2005) and the RGS14 effect on ORM enhancement (Lopez-Aranda et al 2009), here, we intend to investigate the possible relationship between AMPA receptors and RGS14-mediated memory enhancement. In this aim, we will perform gene as well as protein study of AMPA receptors as described in figure 20.

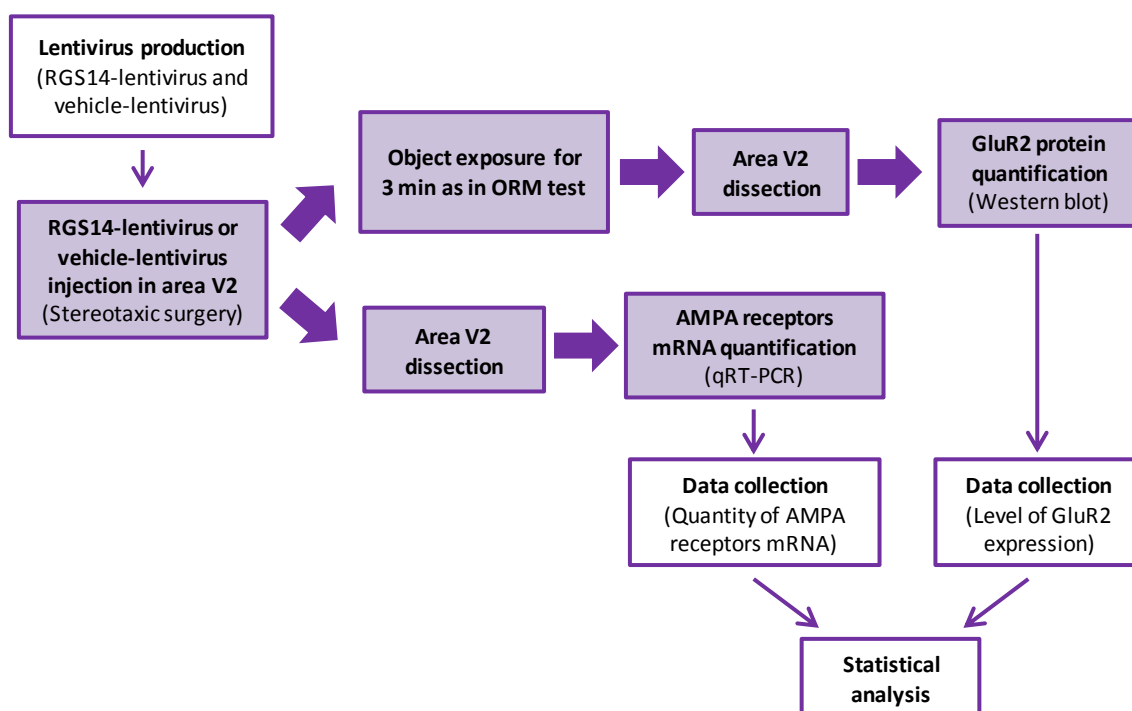


Figure 20. A scheme of experimental design.

3.1.1 AMPA receptors mRNA quantification

A set of 8 rats at age of 3-4 months were treated in area V2 with RGS14-lentivirus (RGS14 group) and another set of 8 rat of the same age with vehicle-lentivirus (vehicle group) (sections III.1.2.1 and III.1.2.2.2). After 21 days of the injection, area V2 was dissected out (section III.3.2.1) and tissues were processed for mRNA quantification by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) (section III.3.2.2).

3.1.2 GluR2 protein quantification

24 rats of 3-4 months of age were used in this study, where 12 rats were treated with vehicle-lentivirus (vehicle group) and other 12 rats with RGS14-lentivirus (RGS14 group) (sections III.1.2.1 and III.1.2.2.2). After 21 days of treatment, rats were exposed to two identical objects for 3 min and were sacrificed in groups of three animals at 20 min, 40 min, 60 min, and 24 h after the exposure (section III.1.2.4). After processing of brain samples, GluR2 protein quantification was carried out by Western blot (section III.3.2.3).

3.2 Methods

Note: The methodological procedure for this block concerning lentivirus production and injection and ORM test is detailed in the sections III.1.2.1, III.1.2.2.2 and III.1.2.4.

3.2.1 Dissection of area V2 of visual cortex from rat brain

Animals were anesthetized with an isoflurane/oxygen mixture and decapitated. After deep anesthesia, brains were dissected out and carefully area V2 of right hemisphere was extracted with a 4 mm punch (DH Material Médico, 94158BP-40F).

3.2.2 qRT-PCR

Punches of area V2 were collected in 1.5 ml tubes containing *RNAlater*[®] *RNA Stabilization Reagent* (Quiagen, 1018087) and stored at 15-25 °C up to 7 days and then 2-8 °C up to 4 weeks, if necessary.

3.2.2.1 Extraction of total RNA

Tissue RNA extraction was performed with *RNeasy Tissue Mini kit* (Quiagen, 74124) following manufacturer's protocol (appendix 1.d). RNA purity and concentration were

determined by measuring absorbance at 260 and 280 nm in *Nanodrop1000*, v3.7 (Thermo Scientific). The concentration of RNA was determined using the formula of one unit at A_{260} is equal to 40 $\mu\text{g/ml}$ of total RNA. A_{260}/A_{280} ratio of RNA samples was between 1.8 and 2, indicating a good purity grade of RNA.

3.2.2.2 Reverse transcription (RT) of total RNA

For removal of genomic DNA (table 12), extracted RNA samples were incubated with rDNase I enzyme at 37 °C for 30 min and the enzyme was inactivated by heating at 75 °C for 10 min. RNA samples were stored at 4 °C.

Table 12. Reaction to remove the genomic DNA.

REAGENT	AMOUNT
10X DNase Buffer (Ambion, AM2235)	1.4 μl
rDNase I (2 U/μl) (Ambion, AM2235)	0.2 U
RNA SAMPLE	1 μg
Nuclease-Free Water (Gibco, 10977)	Up to 14 μl
Total volume	14 μl

The RT reaction was performed with the *High Capacity RNA-to-cDNA kit* (Applied Biosystems, 4387406) as shown in table 13. The reaction was performed at 37 °C for 30 min and reverse transcriptase was inactivated by heating at 95 °C for 5 min. The cDNAs were stored at -20 °C.

Table 13. Reverse transcription reaction.

REAGENT	AMOUNT
2X RT Buffer Mix	16 μl
20X RT Enzyme Mix	1.6 μl
RNA sample (resulting from genomic DNA digestion)	14 μl
Nuclease-Free Water (Gibco, 10977)	0.4 μl
Total volume	32 μl

The cDNA concentration was estimated as in the previous section, using formula of one unit at A_{260} is equal to 33 $\mu\text{g/ml}$ of ssDNA and A_{260}/A_{280} ratio of DNA samples was between 1.8 and 2.

3.2.2.3 Primers for qRT-PCR

3.2.2.3.1 Primers design

Forward and reverse primers (table 14) were designed with the use of software Primer Express, v2.0 (Applied Biosystems). Specificity of primers was checked by the software Primer-Blast (NCBI) (Ye et al 2012) and finally a qRT-PCR simulation was done by the software Amplify 1.2 (University of Wisconsin).

Table 14. qRT-PCR primer sequences.

GEN	REFERENCE (GenBank)	PRIMER SEQUENCE* ¹ (5'→3')	AMPLICON LENGTH (bp)
Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1 (GluR1)	NM_031608.1	Forward: ATGGCATCGGGTACCACTACA	100
		Reverse: AGCTGGAAACCTGTCACATTGG	
Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2 (GluR2)	NM_017261.2	Forward: TGGAGAGCTTGTCTACGGGAAA	100
		Reverse: ACTCATGAAGGGCTTGGAGAAG	
Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3 (GluR3)	NM_001112742.1	Forward: CTGAGAAGCCCTTCCATTTGAA	90
		Reverse: AGAAGTGGGAGCAGAAAGCATT	
Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4 (GluR4)	BC093608.1	Forward: TCAAGGGCTGACTGGGAATG	90
		Reverse: GGTCCTGTGCTTTTCAGTTCAAA	
Ribosomal protein L19 (Rpl19)*²	NM_031103.1	Forward: ATGCCAACTCTCGTCAACAG	102
		Reverse: AGGTGTTCTTCCGGCATCG	

*1 Primers synthesized by Sigma-Aldrich.

*2 Housekeeping gene

3.2.2.3.2 Determination of optimal concentration for qRT-PCR

Three different concentrations of primers (0.45, 0.225 and 0.1125 μM) were tested in a qRT-PCR reaction (section III.3.2.2.5) where each primer concentration was used with 3 different amounts of cDNA (640, 320 or 160 ng) from vehicle group as template. Optimal primer concentration was selected for qRT-PCR experiments based on criteria detailed in

appendix 1.d.2. We found that 0.45 μM primer concentration was optimum for all genes that were subject to study.

3.2.2.4 Creating standard curves

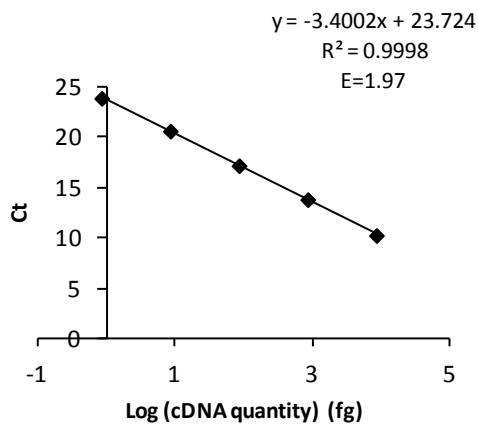
PCR products of each gene (where optimal primer concentration was used) were purified by using *MiniElute PCR purification kit* (Quiagen, 28004) (appendix 1.c.1) and their concentrations were determined by the Nanodrop1000, v3.7 spectrophotometer (Thermo Scientific).

To generate standard curves, five serial dilutions of the purified PCR product of each gene ranging 10^{-4} to 10^{-9} were processed for qRT-PCR where the logarithm of DNA concentration in femtograms was represented on X axis and corresponding Ct value on Y axis. The Ct values of the 10 fold dilution which were not 3.3 cycles apart were discarded. A good linear relationship between Ct and the logarithm of DNA concentration was considered when correlation coefficient (R^2) reached over 0.98. Amplification efficiency (E) is calculated from the slope of the standard curve using the following formula:

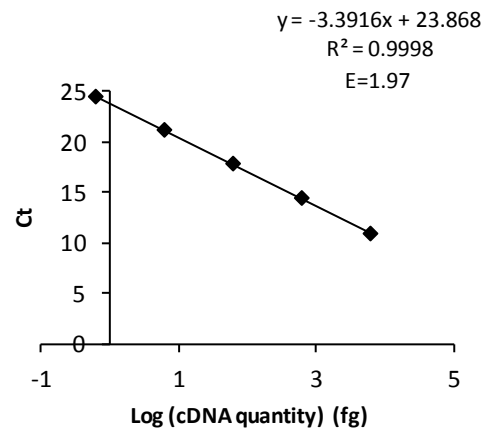
$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

In figure 21 are represented the standard curves of GluR1, GluR2, GluR3 and GluR4 genes and the housekeeping gene Rpl19.

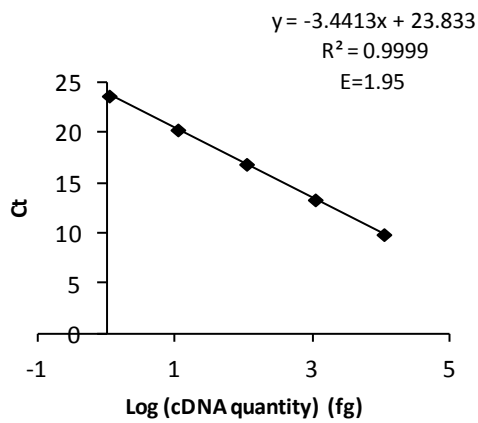
GluR1



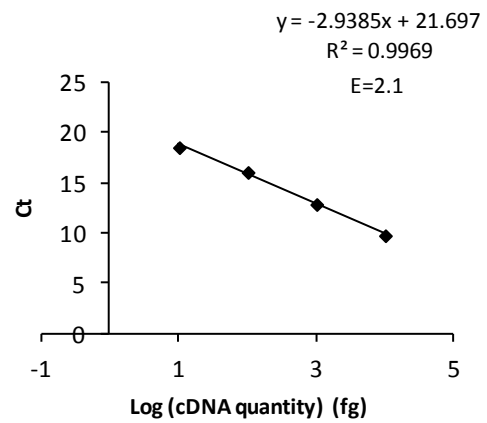
GluR2



GluR3



GluR4



Rpl19 (housekeeping gen)

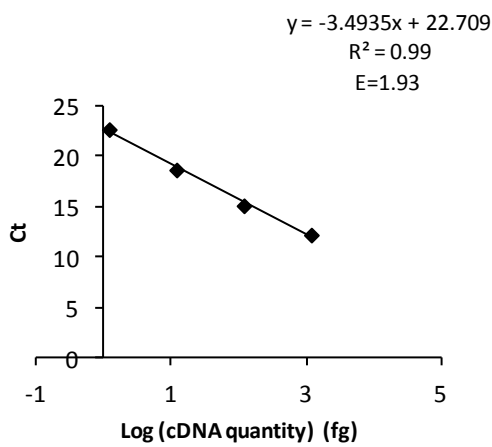


Figure 21. Standard curves of GluR1, GluR2, GluR3, GluR4 and Rpl19 genes. A correlation between logarithm of DNA concentration (fg) and corresponding Ct value of the 10 fold dilution of the cDNA is shown here. E: Amplification efficiency, R^2 : correlation coefficient.

3.2.2.5 qRT-PCR reaction

After primer optimization and standard curve analysis, we set out to perform qRT-PCR for the evaluation of differential gene expression between the brain tissues obtained from control and RGS14-treated rats. The qRT-PCR reactions were performed in *7500 Real-Time PCR Systems* thermocycler (Applied Biosystems), using the *Power SYBR® Green PCR Master Mix kit* (Applied Biosystems, 4367659) as it is detailed in table 15.

Table 15. qRT-PCR reaction using *Power SYBR® Green PCR Master Mix kit*.

REAGENT	VOLUME	FINAL CONCENTRATION
Power SYBR® Green PCR Master Mix (2X)	12 µl	1X
Reverse Primer	8 µl	0.45 µM (each one)
Forward Primer		
cDNA sample	4 µl	640 ng
Total	24 µl	

Triplicates were run for each cDNA sample in a *MicroAmp®Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode* (Applied Biosystems, 4306737). In addition to housekeeping gene, negative control without cDNA was run at the same time. Once all reactive were added, plates were sealed with *qPCR Adhesive Clear Seals* (4titude, 4ti-0560) and centrifuged at 1000 rpm for 1 min at 4 °C in the Centrifuge 5810R (Eppendorf) using the A-4-62 rotor, before placing it on the qRT-PCR thermocycler. The quantitative amplification conditions as well as a standard melt curve protocol are shown in table 16.

Table 16. qRT-PCR amplification cycles and temperatures.

STEP	TEMPERATURE	TIME
Polymerase activation	95 °C	10 min
40 cycles	Denaturation	95 °C 15 s
	Annealing and extension	60 °C 1 min
Melt curve	95 °C	15 s
	60 °C	1 min
	95 °C	30 s
	60 °C	15 s
Hold	4 °C	--

3.2.2.6 Data collection

To determinate the RNA (cDNA) quantity of samples, obtained Ct for each gene were interpolated in the corresponding standard curves. cDNA values corresponding to genes (GluR1, GluR2, GluR3 and GluR4) of RGS14 group or vehicle group were normalized with housekeeping Rpl19 ($Q_{\text{gene}}/ Q_{\text{Rpl19}}$) and percentages of change between vehicle and RGS14 groups were calculated as following:

$$\frac{Q_{\text{gene nor RGS14}} - Q_{\text{gene nor Vehicle}}}{Q_{\text{gene nor Vehicle}}} \times 100$$

3.2.2.7 Statistical analysis

The $Q_{\text{gene nor}}$ were presented as the mean \pm SEM and significant difference between RGS and vehicle were tested by paired t-test (SigmaStat 3.5 software, Jandel Scientific), accepting a confidence interval of 95 % ($p \leq 0.05$).

3.2.3 Western Blot

3.2.3.1 Brain homogenization and protein estimation

Brain punches of injection area V2 were frozen immediately in dry ice and stored at -80 °C. Brain tissues were thawed, weighted and homogenized in 2 ml of 0.01 M Tris-HCl buffer pH 7.4 (appendix 5.a.1) which included 1 % (v/v) protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, P8340) and 1 % (v/v) phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, P0044), using tissue homogenizing system (Glas-Col). Protein concentration of homogenized samples was determined by Lowry method (Lowry et al 1951) (appendix 5.b). 50 μ l aliquots were then lyophilized in SPD1010 SpeedVac System (Thermo Savant) for 45 min without heating and stored at -80 °C until used.

3.2.3.2 Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot

Loading buffer (1X) (Laemmli 1970) (appendix 5.a.3) was added to lyophilized sample. The samples were heated at 95 °C for 10 min twice in a thermostatic block heater TDB-100 (Boeco) to denature and dissolve the proteins. 2.5 μ g and 5 μ g of samples were run

in 4–20 % Mini-PROTEAN® TGX™ precast polyacrylamide gels (Bio-Rad, 456-1096) using electrophoresis unit (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad). SDS-PAGE was run at 150 V (Power-Pac 300, Bio-Rad) and with 1X Tris-Glycine-SDS 1X buffer (TGS) running buffer (appendix 5.a.4). 5 µl of ladder ranging between 10-250 KDa (*Precision Plus Protein™ Dual Color S35* (Bio-Rad, 161-0374), were also loaded in gel. Separated proteins on polyacrylamide gel proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, 1704156) using the *Turbo Trans-Blot* apparatus (Bio-Rad) for 7 min at 25 V, 1.3 A. Membranes were incubated with blocking solution prepared with 10 % (w/v) powdered skimmed milk and 2 % (w/v) BSA (Sigma-Aldrich, A3059) in PBS-Tween pH 7.4 (appendix 5.a.6) for 3 h at room temperature by gentle shaking. Membranes were washed 3 times in PBS-Tween for 5 min each and incubated overnight at 4 °C with the corresponding primary antibody: rabbit monoclonal anti-GluR2 antibody (Abcam, ab133477) at a 1:5000 dilution and mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (as control of protein loading) (Sigma-Aldrich, G8795) at a 1:40000 dilution. After incubation with primary antibody, membranes were washed 3 times and incubated in the corresponding secondary antibody at room temperature for 75 min. Biotinylated secondary antibodies were from horse anti-goat (Vector Lab., BA9500) and goat anti-mouse (Vector Lab., BA-9200).

Both primary and secondary antibodies were prepared in 5 % (w/v) powdered skimmed milk, 2 % (w/v) BSA and 0.1 % (w/v) sodium azide (Sigma Aldrich, S2002) in PBS-Tween. After washing, membranes were incubated with extraAvidin-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich, E2886) (dilution 1:2000 in PBS-Tween) for 50 min at room temperature.

Finally, polypeptide bands corresponding to GluR2 or GAPDH were developed by 3,3'-*diaminobenzidine (DAB) Enhanced liquid substrate system* (Sigma-Aldrich, D3939) as a brown precipitate.

3.2.3.3 Data collection

High resolution images of dried blots were acquired with scanner Epson perfection V750 Pro. Densitometry analysis of bands was performed using Quantity One version 4.3.6 software (Bio-Rad) and O.D. values were normalized with α -tubulin. The optical density of GluR2 protein (RGS or vehicle) was normalized with GAPDH (OD_{GluR2} / OD_{GAPDH}).

Subsequently, the percentage change of GluR2 protein in RGS14 group related to the vehicle was calculated using the O.D normalized values ($OD_{GluR2\ nor}$) as:

$$\frac{O.D_{GluR2\ nor} \text{ RGS14} - O.D_{GluR2\ nor} \text{ Vehicle}}{O.D_{GluR2\ nor} \text{ Vehicle}} \times 100$$

3.2.3.4 Statistical analysis

The values were expressed as mean \pm SEM. A paired Student's t-test (SigmaStat 3.5; Jandel Scientific) comparing normalized O.D values of both treatments were carried out to identify significant differences ($p \leq 0.05$).

4 Fourth block of experiments: Examine the effect of RGS14₄₁₄ treatment on Hebbian synaptic plasticity in perirhinal cortex

4.1 Experimental design

This section was designed to study the possible relationship between RGS14-mediated memory enhancement and Hebbian synaptic plasticity. Considering that perirhinal cortex is one of the most studied cortical areas for delineation of electrophysiological correlates of ORM processing in brain (Brown & Aggleton 2001; Kim et al 2014; Lech & Suchan 2013; Martin et al 2013; Ranganath & Ritchey 2012; Warburton & Brown 2010; Watson & Lee 2013), *in vitro* extracellular field recordings in perirhinal cortex of brain slices of RGS-treated animals were performed. However, before performing electrophysiological studies, an ORM test was carried out to confirm whether RGS14₄₁₄ gene treatment in perirhinal cortex produces an enhancement in ORM similar to seen in area V2 or not. The experimental design of this block of experiments is summarized in figure 22.

Note: Electrophysiological studies were carried out during my stay of 7 months in the group of Dr. Zafar I. Bashir at the University of Bristol (United Kingdom). Nevertheless, results of depotentiation experiments are a representation of results acquired by me at the University of Bristol and the results obtained in collaboration with group of Dr. Robert Nisticó at the University of Rome (Italy).

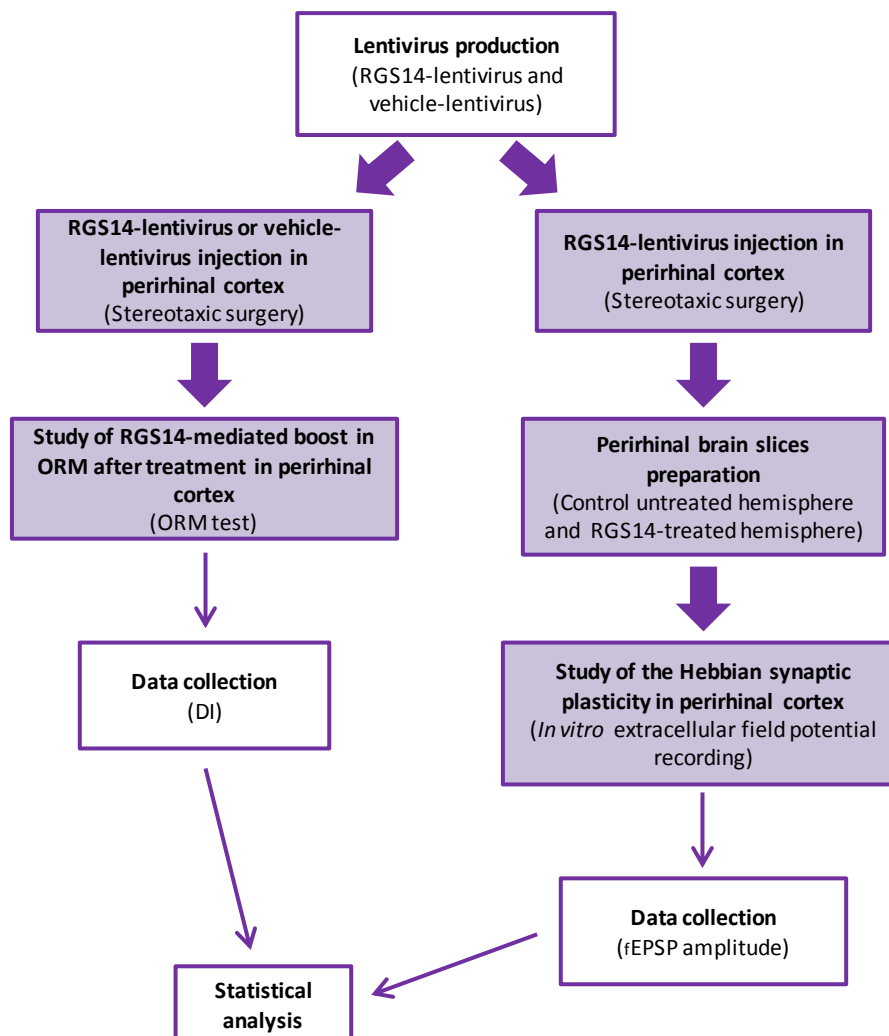


Figure 22. A scheme of experimental design.

4.1.1 Effect of RGS14₄₁₄ gene treatment in perirhinal cortex on ORM

16 rats of 3-4 months of age were used for this study where one set of 8 rats was treated with RGS14-lentivirus (RGS14 group) and other set of 8 rats with vehicle-lentivirus (vehicle group). Here, both sets received treatment in perirhinal cortex using rat atlas coordinates, AP: -4.52, ML: \pm 6.7, DV: -4.75 (sections III.1.2.1 and III.1.2.2.2). After 21 days of injection, these animals were subjected to an ORM test (section III.1.2.4).

4.1.2 Evaluation of RGS14-mediated effect on synaptic plasticity

29 rats of 3-4 months of age were treated with RGS14-lentivirus in perirhinal cortex in one of the two hemispheres (sections III.1.2.1 and III.1.2.2.2). *In vitro* extracellular field

potential recordings (section III.4.2.1) were done in perirhinal cortex slices prepared from RGS14-treated hemisphere (as RGS14 group) and untreated hemisphere (as control group).

4.2 Methods

Note: The methodological procedure for this block concerning lentivirus production and injection and ORM test is detailed in the sections III.1.2.1, III.1.2.2 and III.1.2.4.

4.2.1 Slice preparation and electrophysiology

4.2.1.1 Preparation of perirhinal cortical slices

Animals were anesthetized with an isoflurane/oxygen mixture and decapitated. The brain was rapidly removed and placed into ice-cold modified artificial cerebrospinal fluid (mACSF, rich in sucrose) (appendix 6.1) saturated with 95 % oxygen and 5 % carbon dioxide. A mid-sagittal section was made, the rostral and caudal parts of the brain were removed by single scalpel cuts at $\approx 45^\circ$ to the dorsoventral axis (figure 23), and each hemisphere was glued (cyanoacrylate adhesive, Loctite) by its caudal end to a vibroslice stage (Campden Instruments) and submerged in mACSF.

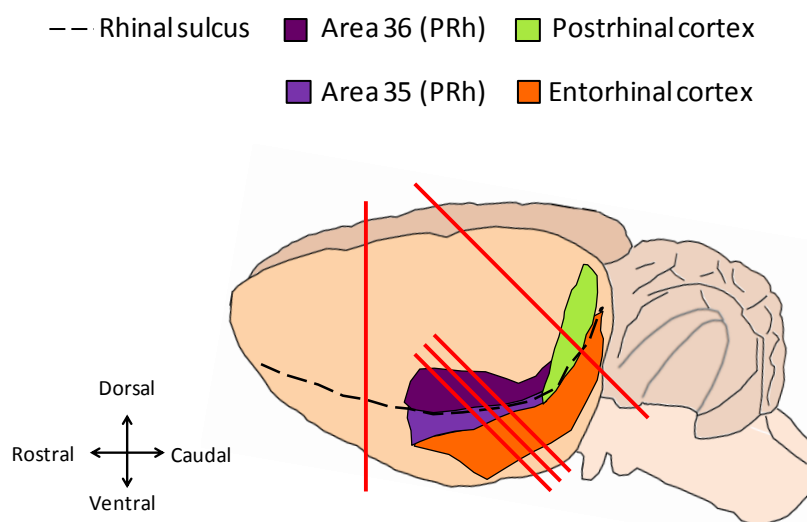


Figure 23. A lateral schematic view of the rat brain. Positions of the perirhinal cortex (Brodmann areas 35 and 36), postrhinal cortex, entorhinal cortex and rhinal sulcus are shown. Diagonal lines indicate the approximate angle at which brain slices were cut.

400 μm coronal slices that included perirhinal cortex (Brodmann areas 35 and 36) (figure 24) and entorhinal and temporal cortices were cut and placed into a holding chamber filled with

oxygenated ACSF (appendix 6.2) at room temperature (20-25 °C) for 1-6 h before transferring to the recording chamber. Slices from each hemisphere were kept separate with experimenter blind to the hemispheric treatment of the slices.

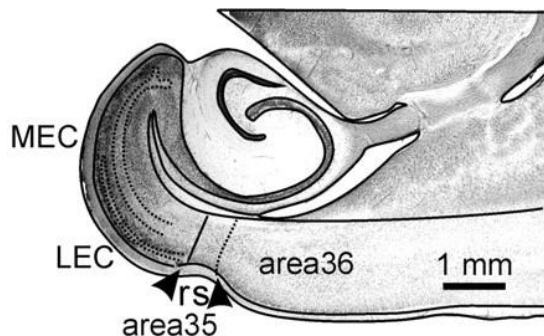


Figure 24. Nissl stained slice cut at angle of 45°. Positions of the perirhinal cortex (Brodmann areas 35 and 36), medial entorhinal cortex (MEC), lateral entorhinal cortex (LEC) and rhinal sulcus (rs) are shown (modified from Kajiwara et al 2003).

4.2.1.2 *In vitro* extracellular field potential recordings

Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) were recorded from layers II/III from directly below the rhinal sulcus (area 35). Two stimulating electrodes were placed on both sides (~ 0.5 mm) of the recording electrode (figure 25). Two pathways (entorhinal pathway (area 35) and temporal pathway (area 36)) were examined to ensure input specificity of any plasticity effect, as previously described (Massey et al 2004; Ziakopoulos et al 1999). Electrode positioning was facilitated using a dissecting microscope (MS-5, Leica Microsystems) and a cold light source (KL-200, Schott).

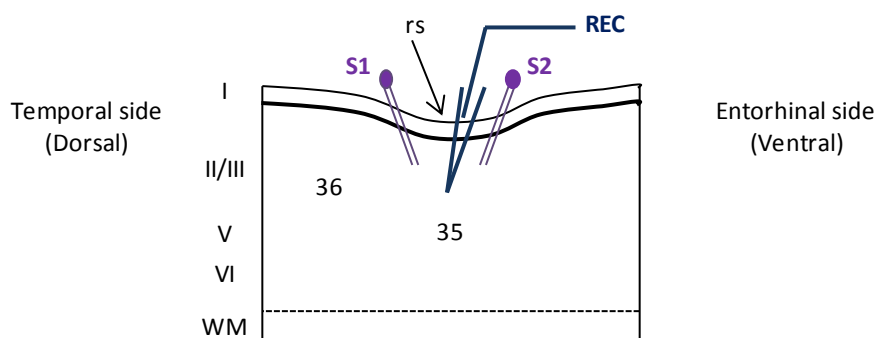


Figure 25. Representation of the perirhinal cortex slice indicating recording electrode (REC) and stimulating electrodes (S1 and S2) positions. Positions of the perirhinal cortex (Brodmann areas 35 and 36), rhinal sulcus (rs) as well as the approximate position of cortical layers I-VI and the white matter (WM) are also shown (modified from Cho et al 2000b).

(i) Perfusion system

A slice was submerged in a recording chamber and oxygenated (95 % O₂ and 5 % CO₂) and warm ACSF was continuously pumped at flow rate of 2 ml/min with a peristaltic pump (Watson-Marlow) under the force of gravity via pre-warmed plastic tubing (ID 1.4 mm, OD 1.9 mm, Portex). The final temperature of the medium in the recording chamber was between 28 °C and 32 °C (temperature did not fluctuate by more than 0.5 °C during a single experiment). Waste ACSF was removed under suction via a needle connected to a vacuum pump (Charles Austen Pumps) to maintain a constant volume of ACSF in the slice chamber.

(ii) Stimulating electrodes

Bipolar stimulating electrodes were made of two strands of nickel-chromium wire (Advent Research Materials, NI653514), which passed through a 1.5 mm OD, 0.86 mm ID glass capillary (Harvard Apparatus, 30-0057). *Blue Tack*TM (Bostik) was used to adjust the length of wire protruding from the capillary. Each electrode was mounted in an isolating platform (VM-3046, Newport Spectra-Physics) on a manipulator (M-152, Narishige) with a magnetic stand (GJ8, Narishige). The electrodes were individually connected to stimulus isolation units (DS2A-Mk.II, Digitimer) which produced constant voltage pulses of 0.1 ms duration triggered via the data acquisition software WinLTP, v.1.01 (Anderson & Collingridge 2007; Anderson et al 2012).

(iii) Recording electrode

The recording electrode was made from borosilicate glass capillary of 1.5 mm OD, 0.86 mm ID pulled on a pipette puller (P-84, Sutter Instruments) whose parameters were adjusted to obtain a pipette tip resistance in the range of 3-10 MΩ. Pipettes were filled the same extracellular recording solution (ACSF) and placed in an electrode holder (Axon instrument). A partially chloride silver wire (Advent research material, AG5485) in the electrode holder was incompletely immersed in the extracellular recording solution providing electrical continuity between the extracellular recording solution and the headstage assembly. The headstage assembly consisted of the electrode holder connected to a headstage (CV203BU, Axon instrument) mounted on a motorized micromanipulator (SM-5, Luigs & Neumann) which allowed a very fine control of the electrode in all planes (x, y and z). A

reference (grounding) electrode consisting of a partially chlorided silver wire was in contact with the recording chamber through a pellet (Model E206, 641310, Harvard apparatus) and connected to the headstage.

(iv) Stimulation protocols

A single pulse was delivered alternately to each stimulating electrode at 0.033 Hz (that is, a pulse each 30 s to each pathway; hence the tissue was alternately stimulated every 15 s). \bar{r} EPSPs were reduced to 50 %-60 % of maximum amplitude to achieve a baseline of synaptic transmission before induction of synaptic plasticity. After a baseline of at least 30 min three stimulation protocols were carried out:

a) Induction of long-term potentiation (LTP) of synaptic transmission through two different protocols of high frequency stimulation (HFS):

- HFS-100 Hz: 4 trains of stimuli, each of 100 Hz lasting 1 s, every 30 s (Massey et al 2004; Ziakopoulos et al 1999).
- HFS-20 Hz: 1 train of stimuli of 20 Hz lasting 1 s.

b) Induction of muscarinic cholinergic receptor-dependent long-term depression (LTD) of synaptic transmission by bath application of a non-selective cholinergic agonist; carbachol (CCh) (Abcam, ab141354) for 10 min at two different concentrations: 50 μ M or 20 μ M (Massey et al 2001).

c) Induction of depotentiation (reversal of LTP) of synaptic transmission through a low frequency stimulation (LFS) protocol (900 stimuli at 1 Hz lasting for 15 min) applied 20 min after LTP induction (Massey et al 2004; Ziakopoulos et al 1999).

\bar{r} EPSP peak amplitudes were measured during the 60 min period, posterior to the induction of synaptic plasticity in each case (after the 2 min HFS induction, the 15 min LFS induction or the 10 min after CCh bath-application). The pathway in which plasticity was induced was randomly allocated; on some occasions, it was the entorhinal and others, the temporal input. LTP, LTD and depotentiation were input specific with no plasticity observed in the nonconditioned pathway (data not shown) as has previously been described (Cho et al 2000b; Massey et al 2004; Warburton et al 2003; Ziakopoulos et al 1999).

4.2.1.3 Data collection

Field responses were monitored through an AxoPatch 200B amplifier (Axon instrument), and amplified 500-fold using a low-pass cut-off frequency of 5 kHz. Signals were digitalized using an analogue-digital converter with a sampling rate of 10 kHz. The data acquisition software Win LTP allowed on-line measurement of peak amplitudes.

4.2.1.4 Statistical analysis

Experiments were analyzed off-line using the analysis software WinLTP 1.01 Reanalysis (Anderson & Collingridge 2007; Anderson et al 2012). Peak amplitude values were measured and expressed relative to the normalized pre-conditioning baseline (30 min) in each experiment. Data pooled across slices were expressed as means \pm SEM and the significance of plasticity changes were established using the appropriate test:

- (i) An unpaired Student's t-test to compare the RGS14 group versus the control group (normalized data).
- (ii) Paired Student's t-test to compare the base line versus LTP or LTD (raw data) in each group (RGS14 or control).
- (iii) A one-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni's *post hoc* test to compare the baseline versus LTP versus depotentiation in each experiment.

These statistical analyses were run in the software SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific) to detect significant differences accepting a 5 % error probability ($p \leq 0.05$).

5 Fifth block of experiments: Analyze brain areas implicated in RGS14-mediated memory enhancement

5.1 Experimental design

The aim of this section was to study the enhancer effect of RGS14 in different brain areas that are part of circuit involved in ORM processing that include area V2, perirhinal cortex and frontal cortex (see section I.2.1.1). Furthermore, to study the possible dependence

of each area in memory processing, the immunotoxin Ox7-SAP was used to lesion a brain area or more than one brain area. The experimental design for this block is described briefly in figure 26.

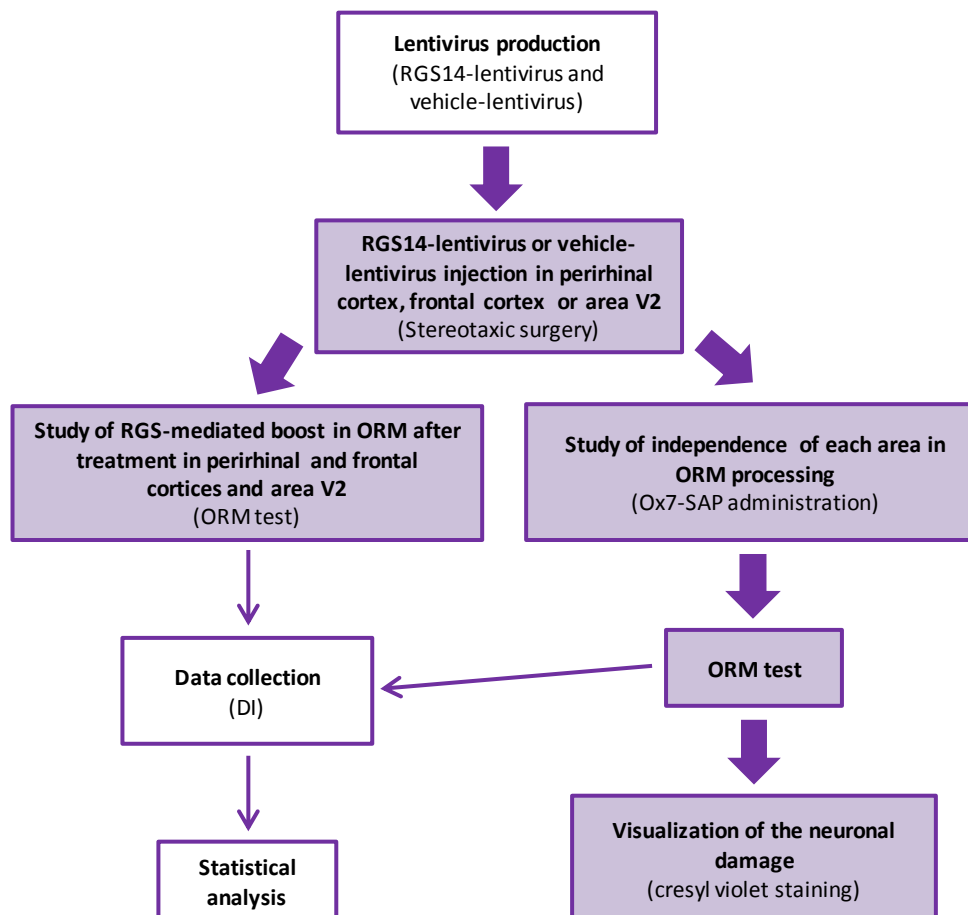


Figure 26. A scheme of experimental design.

5.1.1 RGS14-mediated enhancement in ORM after treatment in either areas V2, perirhinal cortex or frontal cortex

Three groups of rats of 3-4 months of age were used in this study:

- (i) *Area V2 group*: 12 RGS14₄₁₄-lentivirus treated and 12 vehicle-lentivirus treated rats were included in this group. However, injection was done in area V2 of visual cortex using atlas coordinates, AP: -4.3, ML: \pm 2.1, DV: -1.9.
- (ii) *Perirhinal cortex group*: 8 RGS14₄₁₄-lentivirus treated and 12 vehicle-lentivirus treated rats were included here. In this group, injection was done in perirhinal cortex using atlas coordinates, AP: - 4.52, ML: \pm 6.7, DV: - 4.75.

- (iii) *Frontal cortex group*: 8 RGS14₄₁₄-lentivirus treated and 11 vehicle-lentivirus treated rats were included in this study. Here, the injection was done in frontal cortex using atlas coordinates, AP: + 4.7, ML: ± 2.2, DV: -1.

All groups were subjected to ORM test for monitoring their ORM statuses after a delay of 24 h (section III.1.2.4).

5.1.2 Study of dependence of brain areas implicated in RGS14-mediated ORM processing

After treatment of rats with RGS14₄₁₄ gene in either area V2, perirhinal cortex or frontal cortex, a selective elimination of neurons in areas under study was carried out by the administration of Ox7-SAP (Advanced Targeting Systems, IT-02) at a concentration of 0.9 µg/µl in both hemispheres (Krum et al 1997; Nolan & Freeman 2005; Traissard et al 2007). A description on treatment and number of animals used in each condition is described in table 17, table 18, and table 19.

Table 17. Ox7-SAP administration after RGS14 treatment in area V2.

		Vehicle group	RGS14 group
Treatment	Without toxin	n = 12	n = 8
	With Ox7 in V2	---	n = 8
	With Ox7 in Fr	n = 7	n = 10
	With Ox7 in PRh	n = 7	n = 10
	With Ox7 in PRh and Fr	n = 7	n = 8

*In this group, 44 rats were treated with RGS14-lentivirus and 33 rats were treated with vehicle-lentivirus with or without Ox7-SAP.

Table 18. Ox7-SAP administration after RGS14 treatment in perirhinal cortex.

		Vehicle group	RGS14 group
Treatment	Without toxin	n = 11	n = 7
	With Ox7 in PRh	---	n = 10
	With Ox7 in Fr	n = 7	n = 10
	With Ox7 in V2	n = 7	n = 9
	With Ox7 in Fr and V2	n = 7	n = 10

*In this group, 46 rats were treated with RGS14-lentivirus and 32 rats were treated with vehicle-lentivirus with or without Ox7-SAP.

Table 19. Ox7-SAP administration after RGS14 treatment in frontal cortex.

		Vehicle group	RGS14 group
Treatment	Without toxin	n = 10	n = 9
	With Ox7 in Fr	---	n = 10
	With Ox7 in PRh	n = 7	n = 8
	With Ox7 in V2	n = 7	n = 8
	With Ox7 in PRh and V2	n = 7	n = 8

*In this group, 43 rats were treated with RGS14-lentivirus and 31 rats were treated with vehicle-lentivirus with or without Ox7-SAP.

All animals were subjected to ORM test for monitoring their ORM statuses (section III.1.2.4) after a delay of 24 h. Once the behavioral studies terminated, neuronal damage produced by Ox7-SAP administration was confirmed by staining with Cresyl violet (section III.5.2.1).

5.2 Methods

Note: The methodological procedure for this block concerning lentivirus production and injection and ORM test is detailed in the sections III.1.2.1, III.1.2.2.2 and III.1.2.4.

5.2.1 Cresyl violet staining

Previous to the staining (appendix 4 (c, d and e)), sections were mounted on gelatin-coated slides (appendix 4.b) and dried overnight at 37 °C for their complete adhesion. Dried sections were hydrated through PBS 0.1M (30 min) and distilled water (30 min). Afterwards, staining was performed with 1 % Cresyl violet solution (Sigma-Aldrich; C5042) for 15 min. After removal of excess stain with distilled water for 2 min, sections were dehydrated following this order: 70 % ethanol for 10 s and then 90 % ethanol with 10 % glacial acetic acid for 1 min. Then, the sections were submerged in ethanol absolute for 4 min and xylene for 10 min. Finally the sections were mounted with DPX mounting medium (Merck, 1.00579). Sections were analyzed under the DM IRE2 microscope of Leica.

IV. Results

1 Recovery of ORM loss by RGS14₄₁₄ gene treatment in area V2

Memory enhancer effect of RGS14₄₁₄ (Lopez-Aranda et al 2009) was tested in two different ORM-deficient rodent models: normal aging rats and transgenic mice of Alzheimer's disease.

1.1 Study in aging

Discrimination index (DI) values representing capacity for holding information of an object in memory (see in section III.1.2.4.3 for details) of different experimental groups (control without injection, control vehicle-treated and RGS14 gene-treated groups) are shown in figure 27. We observed that 3 months old control rats without treatment were able to retain the information of an object after a delay of 45 min (0.719 ± 0.017), but not after 24 h (0.50 ± 0.054) (one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test, $p = 0.002$). However, when these rats reached to 18 months of age, a drastic drop in ORM was observed and this fall in memory of 45 min was to a level where they were unable to remember the same information (0.507 ± 0.034 , 45 min at 18 months versus 0.719 ± 0.017 , 45 min at 3 months; one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test, $p < 0.001$). After treating these memory-deficient 18 months old rats with RGS14₄₁₄ gene in area V2 (RGS14 group), a full recovery in ORM loss was observed (0.75 ± 0.022 , RGS14 group 45 min at 20 months versus 0.507 ± 0.034 , control group without injection 45 min at 18 months; unpaired Student's t-test, $p < 0.001$). In addition to ORM recovery of 45 min delay, a boost in memory capacity of these RGS-animals was observed. Untreated control animals are incapable of remembering an object information after 60 min of delay (Lopez-Aranda et al 2009) and 24 h delay (0.50 ± 0.054 , 24 h at 3 months); however, RGS14₄₁₄-treated animals could keep the same information in brain even after a delay of 24 h (0.727 ± 0.024 , RGS14 group at 20 months versus 0.507 ± 0.054 , control group without injection at 3 months of age, unpaired Student's t-test, $p = 0.003$). This effect of RGS14₄₁₄ treatment on recuperation of memory loss as well as on boost in memory persisted until 24 months of age (0.721 ± 0.038), an age until animals were able to perform on ORM test. However, in contrast to RGS14₄₁₄ gene treatment, vehicle treatment (control vehicle group) did not produce any effect on memory (0.49 ± 0.035 , 45 min delay; 0.501 ± 0.028 , 24 h delay at 20 months; 0.496 ± 0.041 , 24 h delay at 24 months).

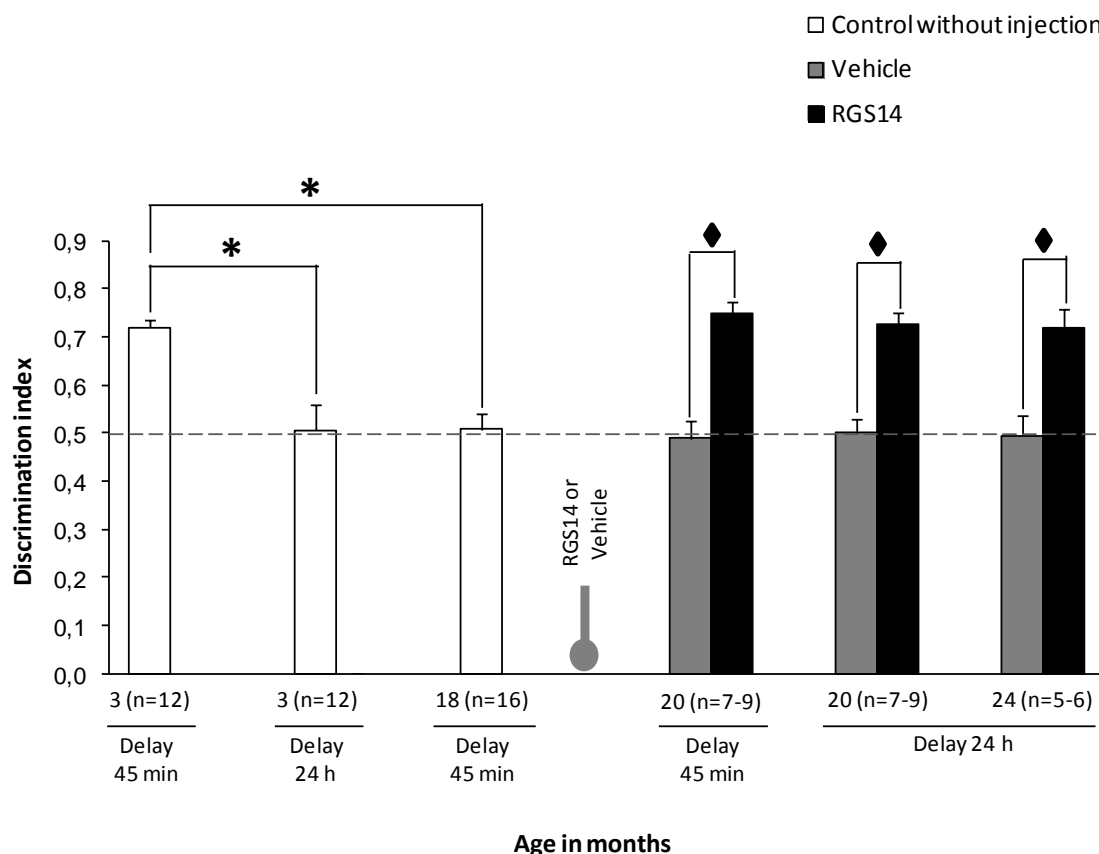


Figure 27. Recovery of an episodic memory loss in aging rats after RGS14₄₁₄ gene treatment in area V2. When normal rats of 3 months of age were exposed to an object for 3 min, they could retain the object information in memory for 45 min and were unable to do so after a delay of 24 h. However, this normal memory of 45 min in rats of 18 months of age was completely lost. A localized RGS14₄₁₄ gene treatment in area V2 of these memory-deficient 18 months old rats led to a full recovery of ORM loss (delay 45 min, 20 months). In addition, this treatment produced an enhancement in this memory which was detectable even after a delay of 24 h (delay 24 h, 20 months) and this effect persisted until 24 months of age (delay 24 h). Number of rats (n) is indicated beneath bars. * shows significant intra-group differences and ◆ shows significant intergroup differences ($p \leq 0.05$).

1.2 Study in Alzheimer's disease

The level of performance of 2 months old AD-mice (AD group) and control wild type mice (WT group) on ORM task were very similar and both groups of animals showed normal ORM status (0.754 ± 0.025 , AD group and 0.768 ± 0.039 WT group) (figure 28). However, in contrary to WT group, AD-mice showed a significant ORM deficit at the age of 4 months (0.795 ± 0.030 , WT group versus 0.560 ± 0.021 , AD group; unpaired Student's t-test, $p < 0.001$). A treatment of these memory-deficient mice with RGS14₄₁₄ gene in area V2 (AD+RGS14 group) led to full recuperation of ORM loss (0.773 ± 0.026 , AD+RGS14 group versus 0.543 ± 0.041 , AD group, 7 months; one-way ANOVA followed by a Tukey's *post hoc* test, $p < 0.001$). This effect of RGS14 treatment persisted in these mice even until 10

months of age (0.698 ± 0.037 , AD+RGS14 group versus 0.523 ± 0.067 AD group, 10 months; one-way ANOVA followed by a Tukey's *post hoc* test, $p = 0.0048$). These AD+RGS14 group mice showed normal ORM similar to WT group (0.773 ± 0.026 , AD+RGS14 group versus 0.726 ± 0.047 , WT group at 7 months and 0.793 ± 0.033 , at 10 months). However, vehicle treatment (AD+vehicle group) showed no effect on memory (0.542 ± 0.026 , 7 months and 0.534 ± 0.045 , 10 months) and their ORM levels were similar to AD group (0.543 ± 0.041 , 7 months and 0.523 ± 0.067 , 10 months).

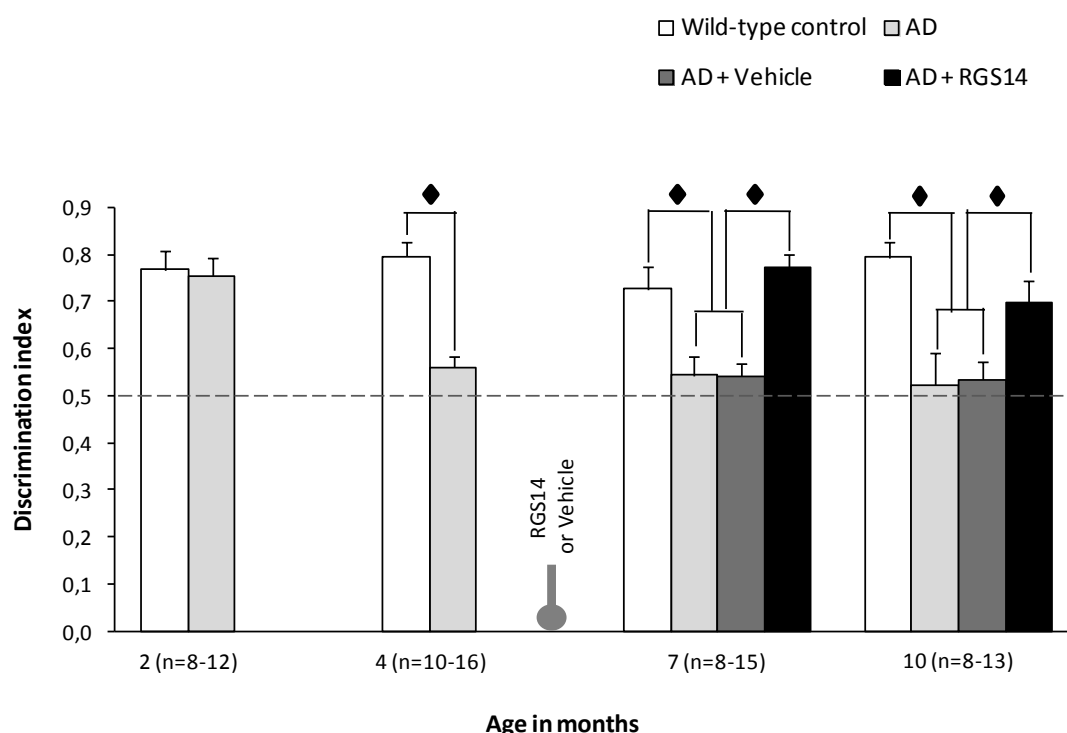


Figure 28. Recovery of ORM loss in AD-mice by RGS14₄₁₄ gene treatment in area V2 of visual cortex. AD-mice of 2 months of age, similar to wild-type, showed normal ORM, however, a substantial ORM loss was observed at 4 months of age. A localized RGS14₄₁₄ gene treatment in area V2 of 4 months old AD-mice led to a full recovery in ORM loss and this recovered memory was maintained even at 10 months of age (7 and 10 months). Number of rats (n) is indicated beneath bars. ♦ shows significant intergroup differences ($p \leq 0.05$). AD: Alzheimer Disease.

2 Mechanism of memory enhancer activity of RGS14₄₁₄

Different drugs (antagonists and inhibitors) were employed (table 11, section III.2.1) with the goal to identify possible pathways implicated in RGS14₄₁₄-mediated ORM enhancement. These drugs were administered to RGS14-treated rats during performance on ORM task and their ORM levels were monitored.

2.1 Implication of AMPA/Kainate receptors

Prior to drugs administration, presence of memory enhancer effect of RGS14₄₁₄ gene treatment was confirmed in RGS-animals. Therefore, three months old RGS-animals were subjected to ORM test with a delay of 24 h, but without drug as shown in figure 29. These RGS-animals showed significant enhancement in ORM (0.696 ± 0.020 , RGS14 group versus 0.522 ± 0.020 , control vehicle group; unpaired Student's t-test, $p = 0.002$). However, a reversal in this ORM enhancement was observed after administration of CNQX, an AMPA/Kainate receptor antagonist (0.475 ± 0.067 , $p < 0.001$); KN62, a Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) inhibitor (0.567 ± 0.027 , $p = 0.002$) and TIQ-A, a Poly[ADP]-ribose polymerase 1 (PARP-1) inhibitor (0.498 ± 0.031 , $p < 0.001$).

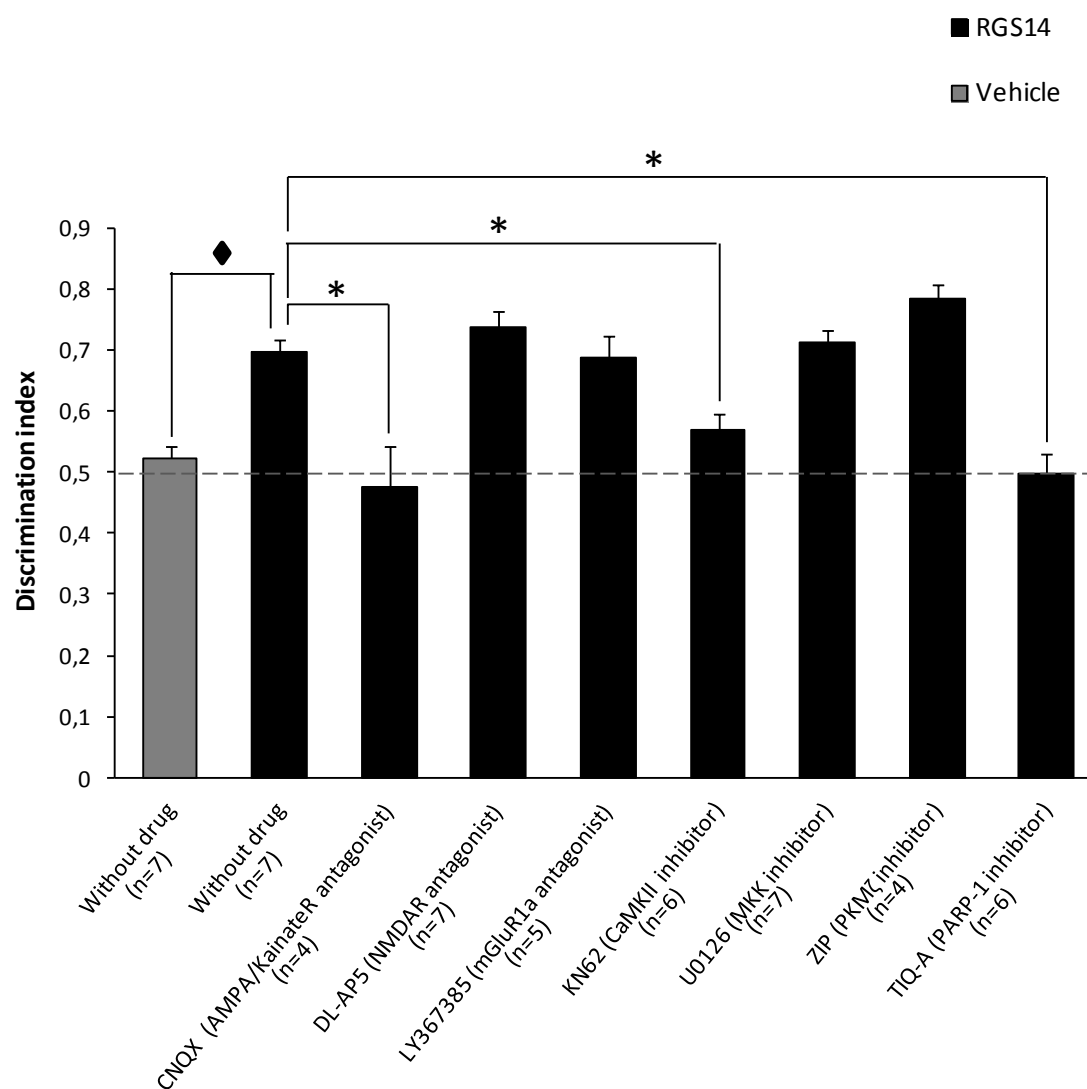


Figure 29. AMPA/Kainate receptors, CaMKII and PARP-1 are involved in RGS-mediated ORM in rats. Administration of the antagonists CNQX, KN62 or TIQ-A reverted the memory enhancement effect of RGS14₄₁₄ gene treatment whereas DL-AP5, LY367385, U0126 and ZIP showed no effect. Number of rats (n) is indicated beneath bars. * shows significant intra-group differences and ♦ shows significant intergroup differences ($p \leq 0.05$).

In contrast, no effect was seen when we administered DL-AP5, a NMDA receptor antagonist (0.736 ± 0.025 , $p = 1$); LY367385, a metabotropic glutamate receptor 1a (mGluR1a) antagonist (0.685 ± 0.025 , $p = 1$); U0126, a MAP kinase kinase (MKK) inhibitor (0.711 ± 0.020 , $p = 1$) and ZIP, a protein kinase M ζ (PKM ζ) inhibitor (0.782 ± 0.025 , $p = 0.832$). One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test was run in this study to determine the difference between drug-treated and untreated groups.

2.2 A dynamic expression of AMPA receptors in RGS-animals

Considering the possible implication of AMPA receptors in RGS14-mediated ORM enhancement demonstrated by the administration of the antagonist CNQX, a gene study of AMPA receptor family (GluR1-4) was carried out, followed by a protein study of GluR2 subunit.

2.2.1 An increase in GluR2 and GluR4 gene expression

Figure 30 shows the results obtained after performing a qRT-PCR of AMPA receptors. RGS14 gene treatment in area V2 led to a significant increase in GluR2 mRNA levels (66.3 ± 6.3 %; paired Student's t-test, $p = 0.006$) and a less but also significant increase in GluR4 mRNA levels (23.3 ± 3.1 %; paired Student's t-test, $p < 0.001$). There was no difference in GluR1 (10.0 ± 5.6 %; paired Student's t-test, $p = 0.163$) and GluR3 (-3.7 ± 1.8 %; paired Student's t-test, $p = 0.189$) mRNA levels.

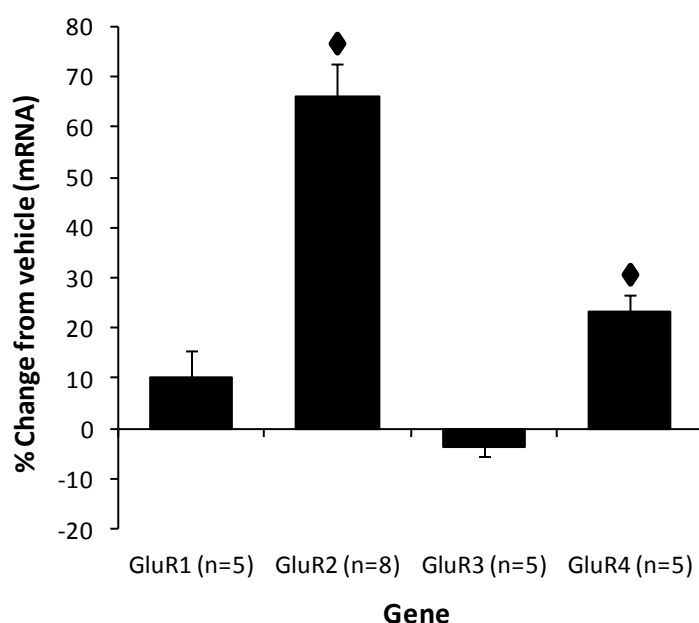


Figure 30. RGS14₄₁₄ gene treatment leads to an increase in GluR2 and GluR4 mRNA expression in area V2 of rats. RGS14₄₁₄ gene treatment caused a significant increase in mRNA levels of GluR2 gene (≈ 65 %) and a less but significant increase in GluR4 gene (≈ 24 %). However there was no difference in GluR1 and GluR3 genes. Number of experiments (n) is indicated beneath bars. \blacklozenge shows significant intergroup differences ($p \leq 0.05$).

2.2.2 Expression pattern of GluR2 protein during ORM processing

A schematic representation of the experimental design for the evaluation of GluR2 protein activity is shown in figure 31.A. Figure 31.B shows an example of one of the western blot experiments where expression of GluR2 and GAPDH (as loading control) protein levels after 20, 40, 60 min and 24 h post-exposure to an object, are represented.

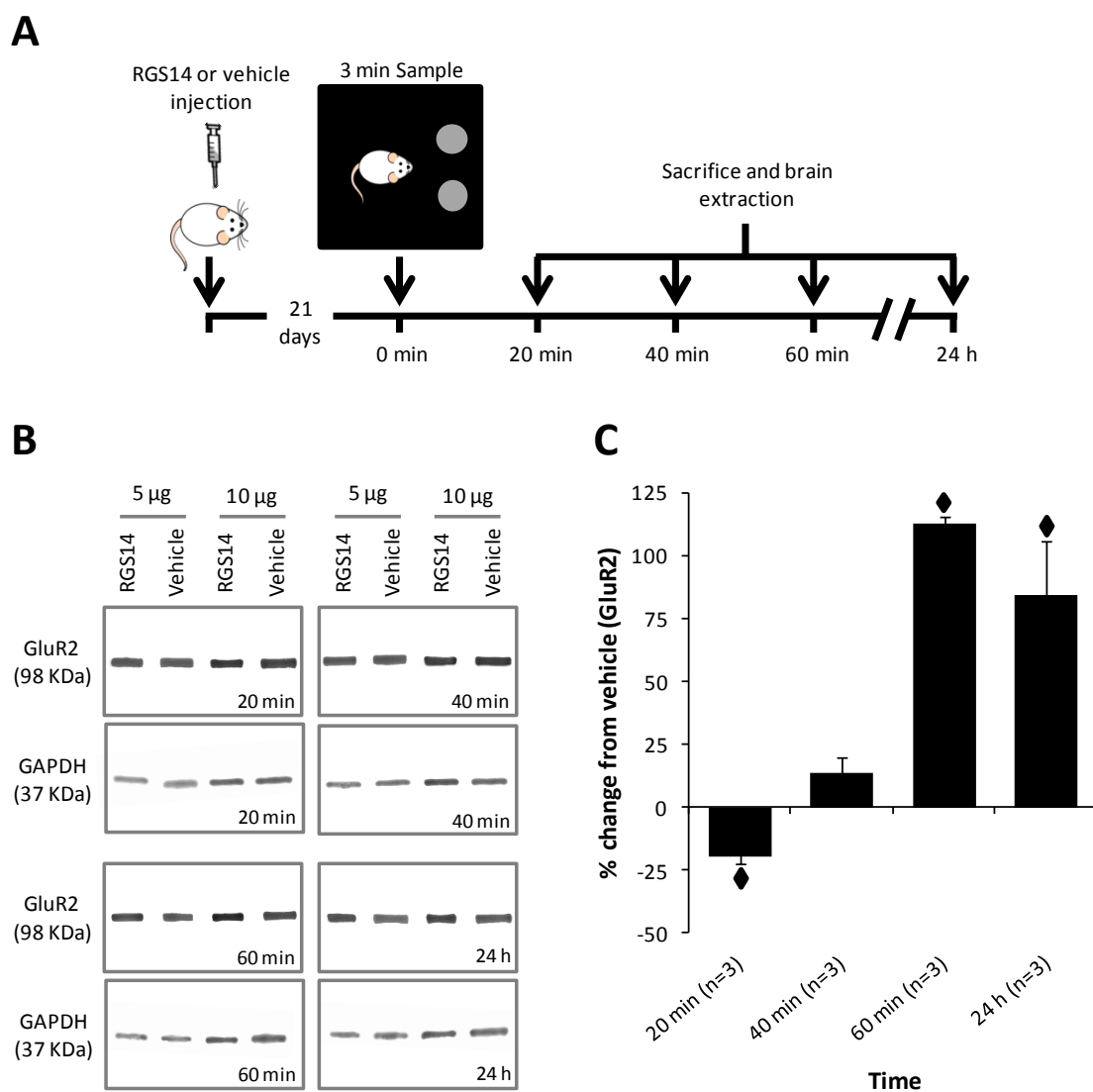


Figure 31. An enhanced activity of GluR2 protein during ORM processing in area V2 of RGS-rats. (A) Schematic representation of experimental design showing time course when area V2 was extracted for Western blot experiments. **(B)** An example of GluR2 and GAPDH (as loading control) expression after 20, 40, 60 min and 24 h of the exposure to an object. **(C)** Summary of Western blot results shows that RGS14 gene treatment caused a significant decrease in GluR2 protein after 20 min of exposure to an object and then a robust increase in this protein was observed after 60 min and 24 h. Number of experiments (n) is indicated beneath bars. \blacklozenge shows significant intergroup differences ($p \leq 0.05$).

Figure 31.C shows GluR2 protein expression levels during ORM processing. A significant decrease in GluR2 protein levels was observed after 20 min (-19.6 ± 2.9 %, paired Student's t-test, $p = 0.036$) of objects exposure, and a significant increase after 60 min (112.3 ± 2.9 %, paired Student's t-test, $p = 0.013$) and 24 h (84.1 ± 21.4 %, paired Student's t-test, $p = 0.025$). However, no difference was observed after 40 min (13.4 ± 6.7 %, paired Student's t-test, $p = 0.114$).

2.3 The relationship between ORM and synaptic plasticity in perirhinal cortex

Considering the memory enhancer effect of RGS14 protein in area V2, we next tested whether this protein can produce the same effect in perirhinal cortex or not. Because this area is one of the most studied cortical areas that has been used for delineation of electrophysiological correlates of ORM processing in brain (Brown & Aggleton 2001; Kim et al 2014; Lech & Suchan 2013; Martin et al 2013; Ranganath & Ritchey 2012; Warburton & Brown 2010; Watson & Lee 2013). This study will allow us to determine the relationship between the effect of RGS14 seen on ORM in behavioral studies and the Hebbian synaptic plasticity.

2.3.1 RGS14₄₁₄-mediated ORM enhancement in perirhinal cortex

Rats with 3 months of age were treated with RGS-lentivirus or vehicle-lentivirus in perirhinal cortex and their performance on ORM test (section III.1.2.4) were monitored after a delay of 24 h. As it is shown in figure 32, RGS14-treated rats were able to keep the information on previously exposed objects in memory (0.763 ± 0.010), whereas in contrary, control vehicle group animals were unable to do so (0.531 ± 0.018 , unpaired Student's t-test, $p < 0.001$).

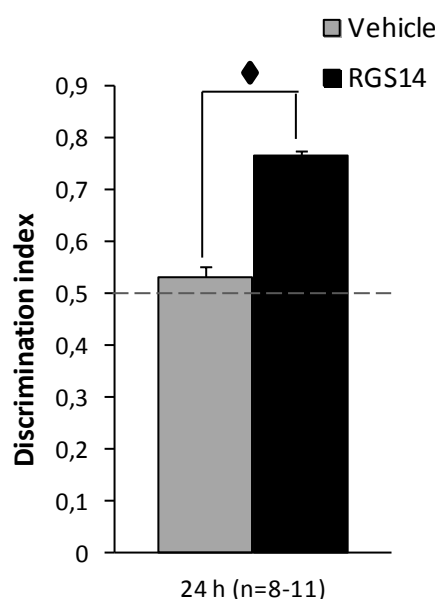


Figure 32. RGS14₄₁₄ gene treatment into perirhinal cortex produces an enhancement in ORM similar to observed in area V2 of rat brain. In an ORM test, we observed that vehicle group of animals were unable to recognize an object after a delay of 24 h, however RGS-treated animals could retain in the memory the information on the same object. Number of rats (n) is indicated beneath bars. ♦ shows significant intergroup differences ($p \leq 0.05$).

2.3.2 Study of synaptic plasticity

Having confirmed the ORM enhancer effect of RGS14 protein in perirhinal cortex, we wanted to determine whether RGS14 gene treatment produced changes in the Hebbian synaptic plasticity. Therefore, *in vitro* extracellular field potential recordings were performed in slices of rat perirhinal cortex using different stimulation protocols for the induction of: (i) long-term potentiation (LTP), (ii) muscarinic receptor-dependent long-term depression (LTD), and (iii) depotentiation.

2.3.2.1 Effect of RGS14₄₁₄ on LTP induced by high frequency stimulation (HFS)

Normalized fEPSP amplitude values that were obtained after induction of LTP in perirhinal cortex, are represented in figure 33 as mean \pm SEM (section III.4.2.1.3). Two different protocols of HFS were employed: (i) 4 trains of stimuli of 100 Hz where each train lasted for 1s and was every 30 s (figure 33.A), and (ii) 1 train of stimuli of 20 Hz that lasted 1 s (figure 33.B).

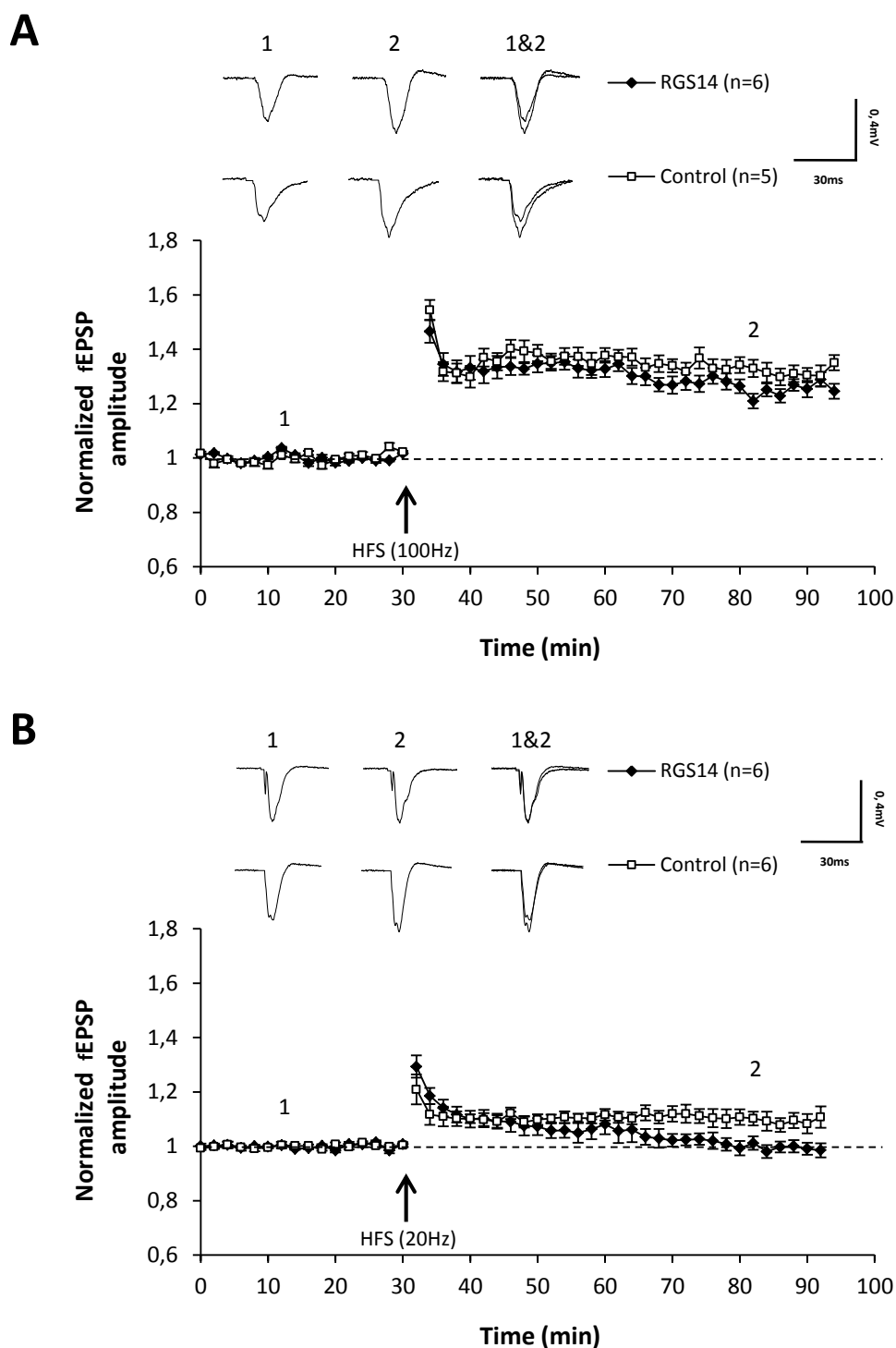


Figure 33. Alteration in LTP induced by 20 Hz but not by 100 Hz in perirhinal cortex of RGS-treated rats. (A) *In vitro* extracellular field recordings show no difference in the magnitude of LTP induced by 100 Hz HFS (4 train of 1 s stimulation; indicated by arrow) between RGS14-treated ($n = 6$; $p = 0.003$) and non-treated groups ($n = 5$; $p < 0.001$) (B) However, LTP induced by 20 Hz HFS (1 train of 1 s stimulation; indicated by arrow) led to a retard fall during the maintenance of LTP in RGS14 group ($n = 6$, $p = 0.764$) when compared to control group ($n = 6$, $p = 0.024$). Traces above the graphs of A and B are representative fEPSP responses taken from appropriate time points as indicated in 1 and 2. Each trace is the average of four sweeps and stimulus artifacts have been removed for the presentation. Values of normalized fEPSP amplitudes are represented as mean \pm SEM. Number (n) represents number of animals used.

Results of *in vitro* extracellular field recordings show a similar level of induction of LTP after application of 100 Hz HFS in RGS14-treated group (paired Student's t-test, $p = 0.003$) as non-treated control group (paired Student's t-test, $p < 0.001$) (figure 33.A). However, when HFS was applied at 20 Hz, no LTP induction in RGS14 group of animals was observed (paired Student's t-test, $p = 0.764$), but it could successfully be induced in control group of animals (paired Student's t-test, $p = 0.024$) (figure 33.B).

2.3.2.2 Effect of RGS14 on LTD induced by stimulation of muscarinic cholinergic system

Normalized fEPSP amplitude values (section III.4.2.1.3) that were obtained after induction of muscarinic cholinergic receptor-dependent LTD in perirhinal cortex, are represented as mean \pm SEM in figure 34. These inductions were carried out by 10 min bath application of two concentrations of carbachol, an agonist of muscarinic cholinergic system: (i) 50 μ M (figure 34.A), and (ii) 20 μ M (figure 34.B). Data obtained from *in vitro* extracellular field potential recordings (figure 34) show an induction of LTD upon application of 50 μ M of carbachol in both RGS14-treated group (paired Student's t-test, $p = 0.004$) and non-treated control group (paired Student's t-test, $p < 0.001$), and this induction in LTD was very similar in both group of animals. However, in contrast, application of a lower concentration, 20 μ M, of carbachol produced no LTD in RGS14 group of animals (paired Student's t-test, $p = 0.056$), but successfully induced LTD in control group of animals (paired Student's t-test, $p = 0.006$).

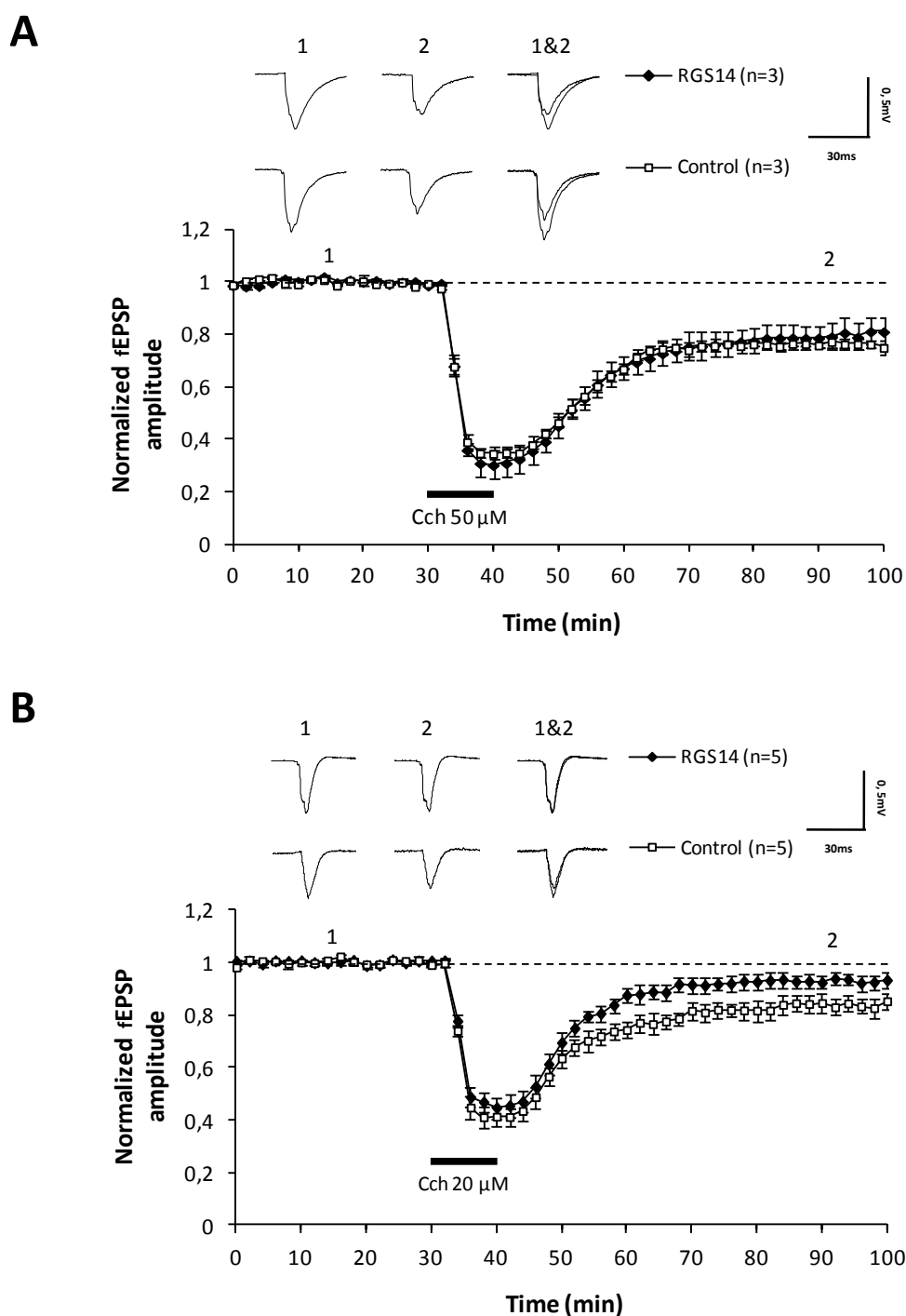


Figure 34. Alteration in LTD induced by carbachol at 20 μ M but not at 50 μ M in perirhinal cortex of RGS-treated rats. (A) *In vitro* extracellular field recordings show that bath application of carbachol (CCh) at 50 μ M concentration for 10 min (black thick bar) produced a strong depression followed by LTD in RGS14 group (n = 3, p = 0.004) which was similar to control group (n = 3, p < 0.01). **(B)** However, when used at 20 μ M concentration for 10 min (black thick bar) a failure in the maintenance of LTD was observed in RGS14 group (n = 5, p = 0.056). Traces above the graphs of A and B are representative fEPSP responses taken from appropriate time points as indicated in 1 and 2. Each trace is the average of four sweeps and stimulus artifacts have been removed for the presentation. Values of normalized fEPSP amplitudes are represented as mean \pm SEM. Number (n) represents number of animals used.

2.3.2.3 Effect of RGS14 on depotentiation produced by low frequency stimulation (LFS)

Results of *in vitro* extracellular field recordings that were obtained after induction of a depotentiation by application of LFS consisting of 900 stimuli at 1 Hz during 15 min in perirhinal cortex are represented in figure 35. 20 min prior to application of LFS for the development of depotentiation, brain slices with perirhinal cortex were subjected to a protocol of 100 Hz HFS to induce LTP. A one-way ANOVA with repeated measures followed by a Bonferroni's *post hoc* test by comparing the base line versus LTP or depotentiation in each group, shows as expected, an induction of LTP in both RGS14-treated and control groups ($p < 0.001$). However, application of 1 Hz stimulation in same brain slices led to generation of depotentiation in control group ($p = 0.002$) and no in RGS-treated group ($p = 0.565$). A significant difference in depotentiation was observed between RGS and control groups (unpaired Student's t-test, $p = 0.034$).

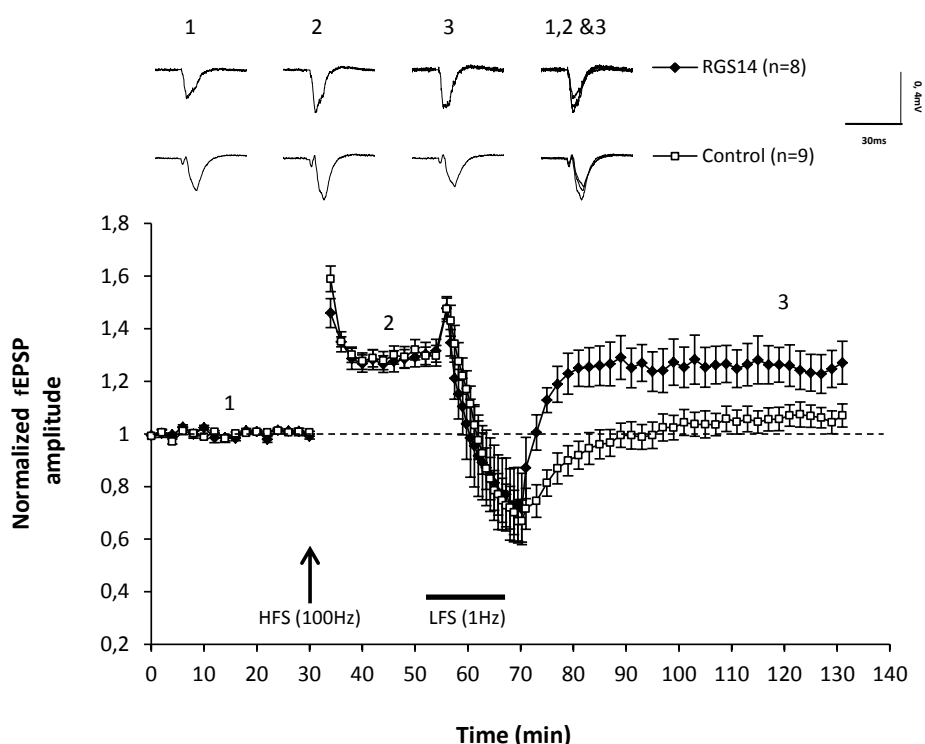


Figure 35. Lack of depotentiation in perirhinal cortex of RGS14-treated rats. *In vitro* extracellular field recordings show that after induction of LTP (4 train of 1 s stimulation at 100 Hz, indicated by arrow), depotentiation was induced by the application of 1 Hz stimulation for 15 min (black thick bar). There was a lack in depotentiation of RGS-treated rats ($n = 8$, $p = 0.565$). Traces above the graph are representative fEPSP responses taken from appropriate time points as indicated in 1, 2 and 3. Each trace is the average of four sweeps and stimulus artifacts have been removed for the presentation. Values of normalized fEPSP amplitudes are represented as mean \pm SEM. Number (n) represents number of animals used.

2.3.2.4 Summary of RGS14 effect on Hebbian plasticity in perirhinal cortex

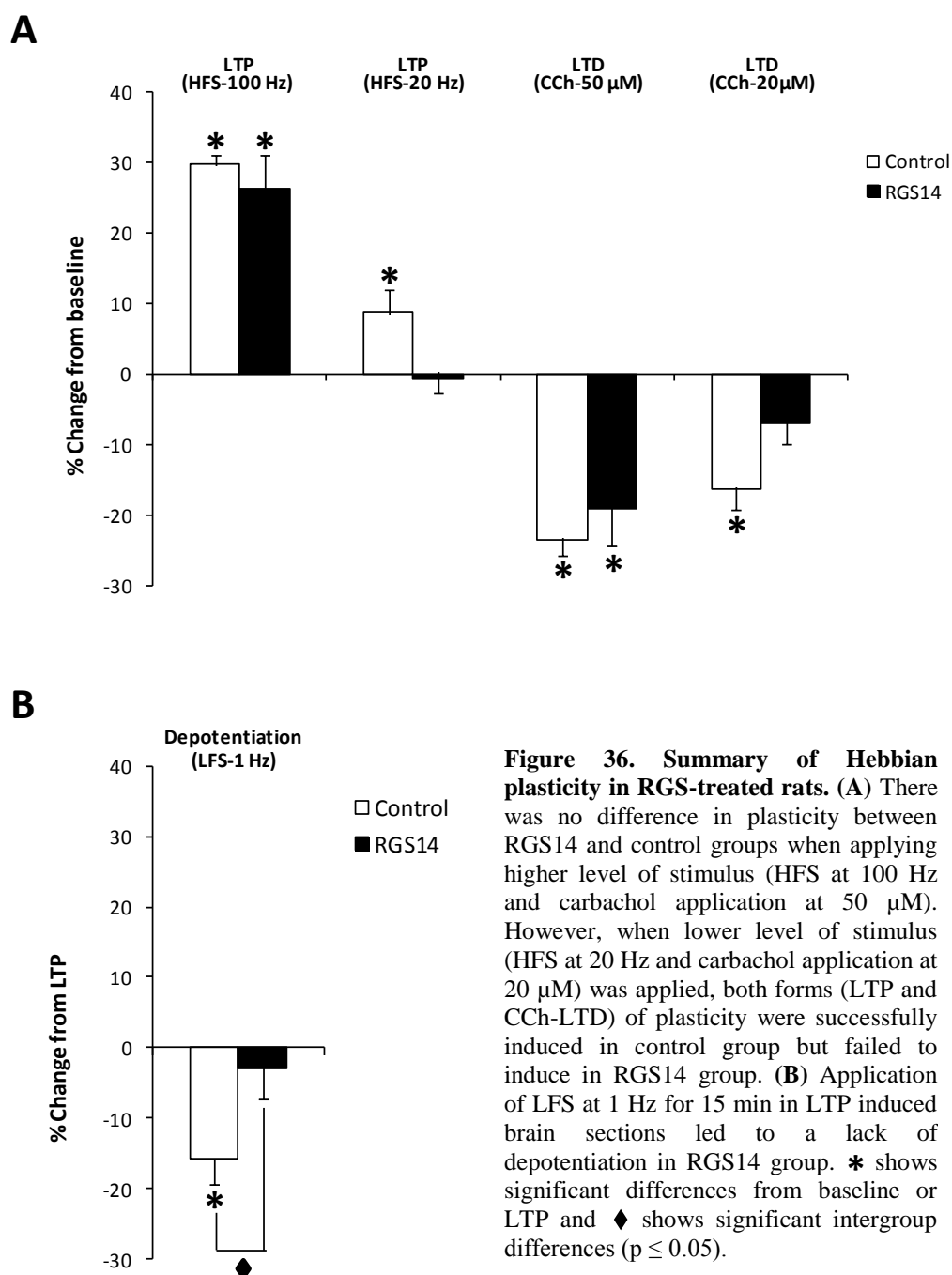


Figure 36 shows a summary of synaptic plasticity (LTP, muscarinic cholinergic receptor-dependent LTD and depotentiation) in perirhinal cortex in RGS14 and control groups. The percentages of change of normalized fEPSP amplitude ($A_{fEPSP_{nor}}$) of the RGS14 or control groups from baseline (figure 36.A) or from LTP in the case of depotentiation induction (figure 36.B) are calculated using equation as described in following:

$$\frac{A fEPSP_{nor(\text{control or RGS14})} (\text{LTP, LTD, Dep.}) - A fEPSP_{nor(\text{control or RGS14})} (\text{baseline or LTP})}{A fEPSP_{nor(\text{control or RGS14})} (\text{baseline or LTP})} \times 100$$

As demonstrated in figure 36.A, application of higher level of stimulus (HFS at 100 Hz and bath application of carbachol at 50 μM) led to an induction of LTP and CCh-LTD in RGS14 group (LTP, 26.271 ± 4.925 % and LTD, -19.022 ± 5.276 %) and in control group (LTP, 29.780 ± 1.451 % and LTD, -23.545 ± 2.242 %), while application of lower level of stimulus (HFS at 20 Hz and bath application of carbachol at 20 μM) produced neither LTP nor CCh-LTD in the RGS14 group (LTP, -0.697 ± 2.008 % and LTD, -7.012 ± 2.785 %), but in control group application of lower level of stimulus generated both LTP and CCh-LTD (LTP, 8.906 ± 3.027 % and LTD, -16.221 ± 2.92 %). In addition, as shown in figure 36.B, the application of LFS at 1 Hz during 15 min in LTP induced brain sections showed a lack of depotentiation in RGS14 group of animals (-2.868 ± 4.298 %) and in contrary, control group (-15.769 ± 3.570) showed a successful depotentiation.

3 Independent brain areas implicated in ORM processing

In addition to area V2 and perirhinal cortex, frontal cortex is an area also known to be crucial in ORM processing (Banks et al 2012; Swick & Knight 1999; Warburton & Brown 2010). Therefore, we examined the role of these 3 areas and their dependence in enhanced ORM processing in RGS14₄₁₄ gene-treated rats.

3.1 RGS14 enhancer effect on ORM in area V2, perirhinal and frontal cortices

As it is shown in figure 37, RGS14₄₁₄ gene treatment in area V2 and perirhinal and frontal cortices, unlike their corresponding control vehicle, led to an enhancement in ORM. Results show that RGS-animals, which were treated in three brain areas, were able to retain information of an object in memory after a delay of 24 h. An unpaired Student's t-test between RGS14 group and control vehicle group showed significant difference in area V2 (0.696 ± 0.020 , RGS14 group versus 0.515 ± 0.025 , control vehicle group; $p < 0.001$); in perirhinal cortex (0.763 ± 0.012 , RGS14 group versus 0.531 ± 0.018 , control vehicle group; $p < 0.001$); and in frontal cortex (0.745 ± 0.048 , RGS14 group versus 0.454 ± 0.043 , control vehicle group; $p < 0.001$). These observations further confirm memory enhancer effect of RGS14.

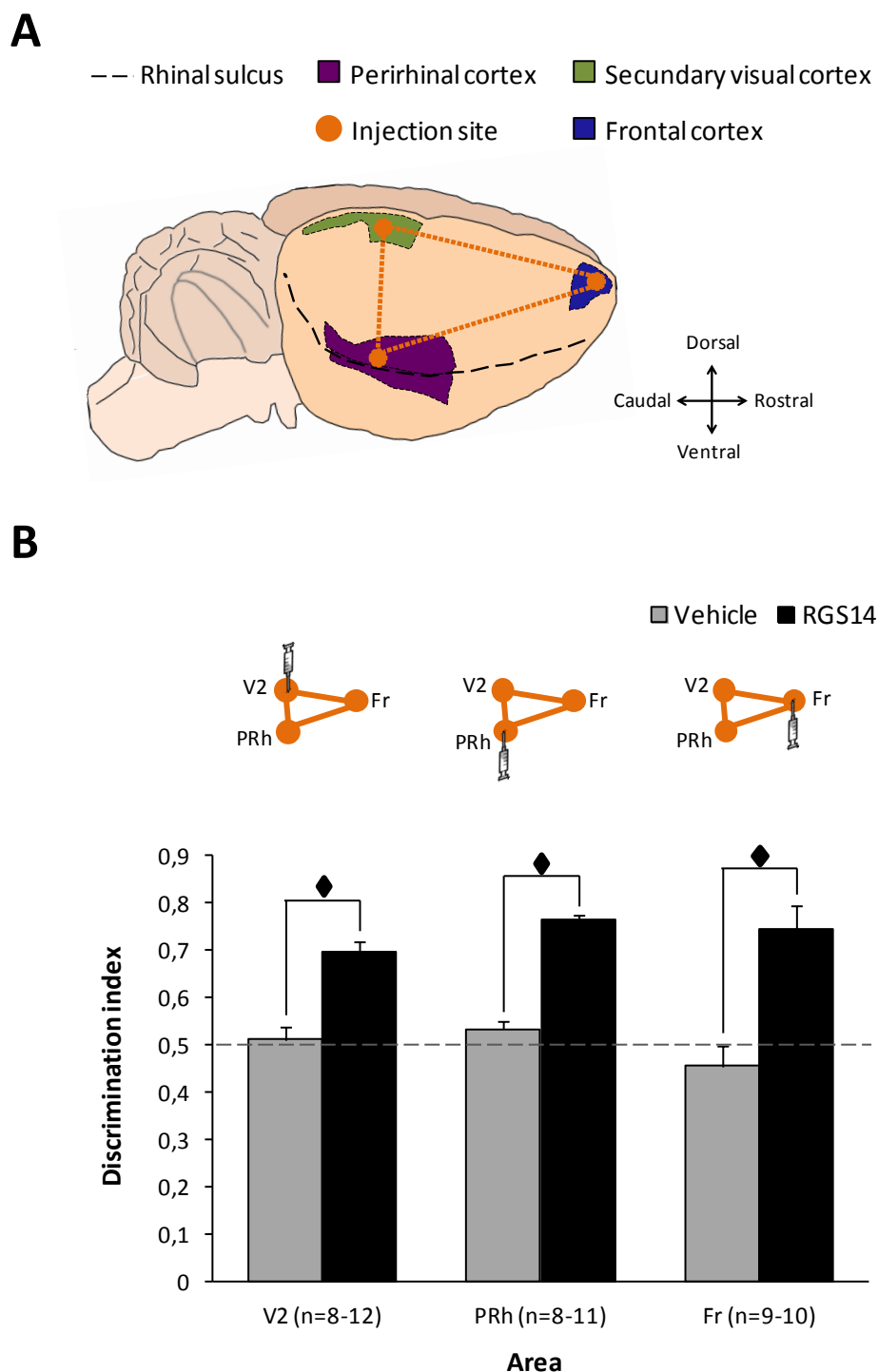


Figure 37. RGS14₄₁₄ gene treatment in area V2, perirhinal and frontal cortices produces an ORM enhancement. (A) A schematic lateral view of the rat brain showing injection sites: perirhinal cortex (PRh), frontal cortex (Fr) and area V2 (V2). (B) RGS14₄₁₄ gene treatment in either area V2, PRh or Fr, produced a robust increase in ORM. This memory enhancement was similar to reported previously in area V2. Injections shown in each drawing on top of graph B, indicate RGS treatment site and corresponding results are shown just beneath in bars. Number of rats (n) is indicated beneath bars. ♦ shows significant intergroup differences ($p \leq 0.05$).

3.2 Independent brain domains in ORM-processing

After determination of the implication of area V2 and perirhinal and frontal cortices in ORM, we considered to test the degree of independence of these areas in RGS-mediated memory processing. Here, we have used Ox7-SAP, an immunotoxin that selectively eliminates neurons, as a tool for the generation of lesion in brain (figure 38).

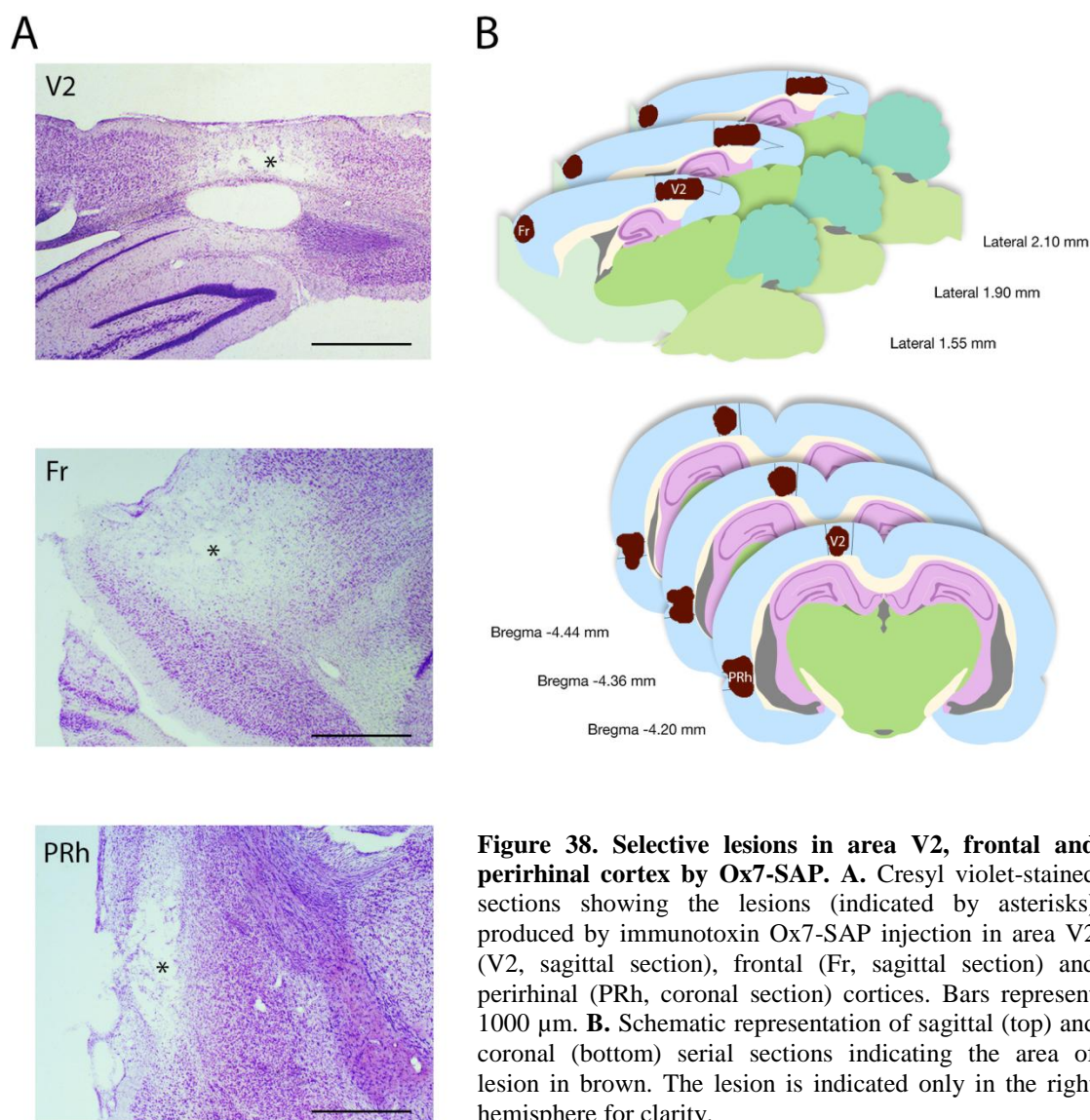


Figure 38. Selective lesions in area V2, frontal and perirhinal cortex by Ox7-SAP. **A.** Cresyl violet-stained sections showing the lesions (indicated by asterisks) produced by immunotoxin Ox7-SAP injection in area V2 (V2, sagittal section), frontal (Fr, sagittal section) and perirhinal (PRh, coronal section) cortices. Bars represent 1000 µm. **B.** Schematic representation of sagittal (top) and coronal (bottom) serial sections indicating the area of lesion in brown. The lesion is indicated only in the right hemisphere for clarity.

3.2.1 Independence of Area V2 in ORM

The results of performance on ORM test of rats who have received RGS14₄₁₄ treatment in area V2 and were lesioned by Ox7-SAP either in frontal cortex, perirhinal cortex or frontal + perirhinal cortices, are shown in figure 39. The memory enhancer effect of

RGS14₄₁₄ in area V2 was first confirmed (RGS14 group 0.696 ± 0.020 versus control vehicle group 0.510 ± 0.024 ; unpaired Student's t-test, $p < 0.001$). This RGS14-mediated effect on ORM was completely abolished after a selective lesion of area V2, area of RGS14₄₁₄ injection, by Ox7-SAP administration (0.517 ± 0.026 , $p < 0.001$). However, lesions in frontal cortex (0.702 ± 0.026), perirhinal cortex (0.668 ± 0.033) or even frontal + perirhinal cortices (0.715 ± 0.016) did not produce any effect on memory enhancer effect of RGS14 ($p \leq 0.05$).

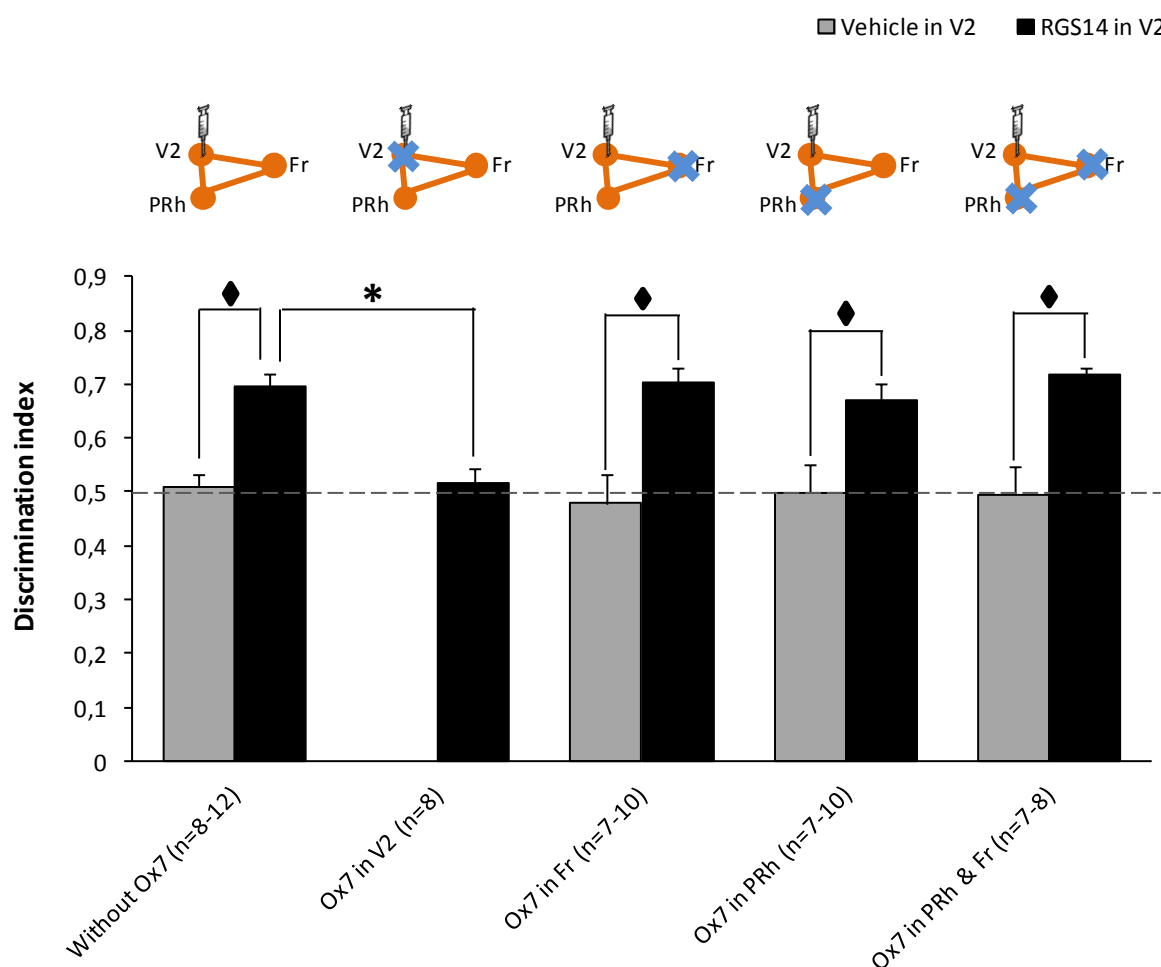


Figure 39. RGS14₄₁₄ gene-mediated ORM enhancement in area V2 is independent of perirhinal and frontal cortices. A selective elimination of area V2 neurons by Ox7 treatment completely abolished the ORM enhancement seen after RGS-mediated activation of same area neurons (Bars in “Without Ox7” versus “Ox7 in V2”). This memory enhancement emergence after RGS treatment in area V2 was not affected at all when Ox7 was applied either in frontal (Fr) and perirhinal (PRh) cortices or in both areas together. Injections shown in drawings on top of graph indicate RGS treatment sites and crosses indicate Ox7 treatment sites in each case. Their corresponding results are shown just beneath of them. Number of rats (n) is indicated beneath bars. * shows significant intra-group differences and ◆ shows significant intergroup differences ($p \leq 0.05$).

3.2.2 Independence of perirhinal cortex in ORM

Similar to area V2, after confirmation of the enhancer effect of RGS14 in rats treated with RGS14₄₁₄ gene in perirhinal cortex (RGS14 group 0.760 ± 0.011 versus control vehicle group 0.531 ± 0.018 ; unpaired Student's t-test, $p < 0.001$), a lesion in the same area by Ox7-SAP administration, led to complete abolition of enhanced ORM (0.480 ± 0.025 , $p < 0.001$) (figure 40). However, lesions in area V2 (0.728 ± 0.051), frontal cortex (0.682 ± 0.045) or area V2 + frontal cortex (0.708 ± 0.028) did not cause any effect on RGS-mediated ORM enhancement ($p \leq 0.05$).

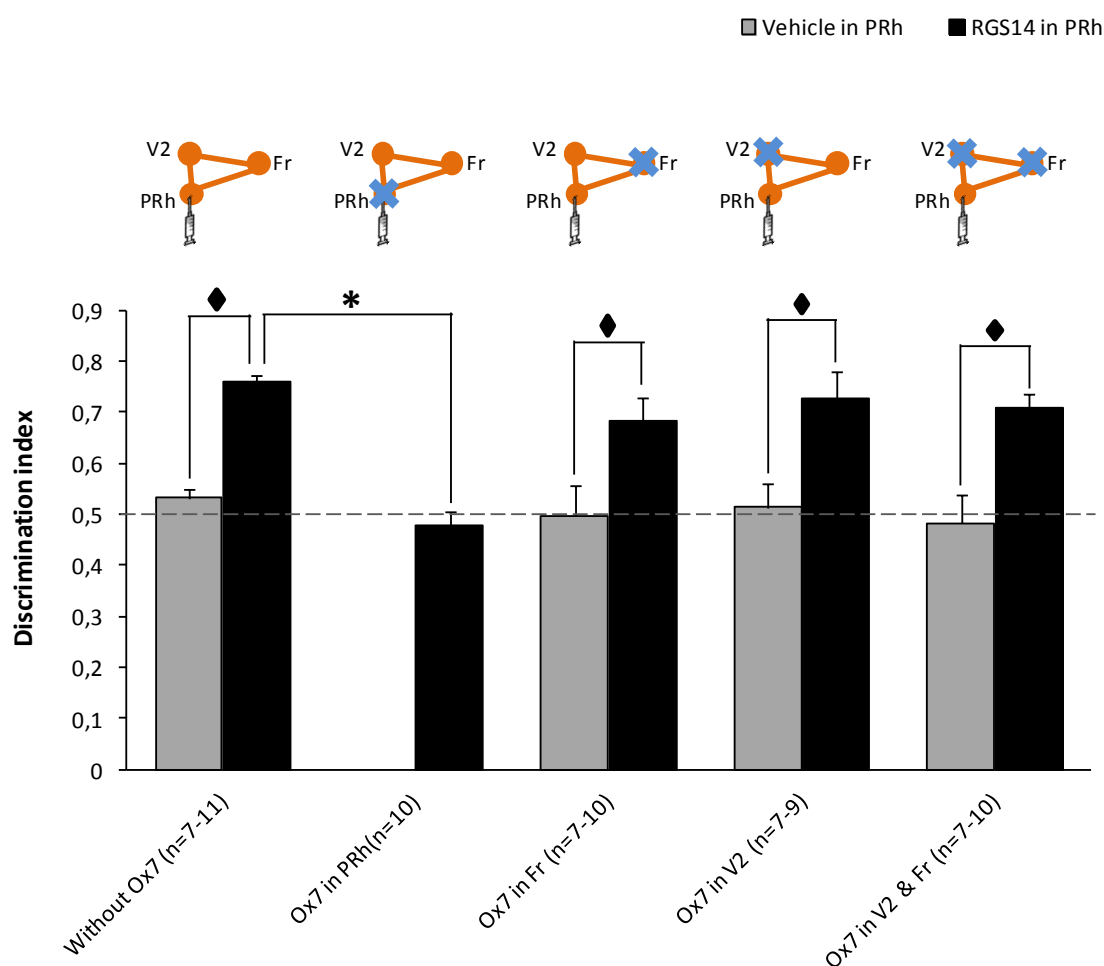


Figure 40. RGS14₄₁₄ gene treatment-mediated ORM enhancement in perirhinal cortex is independent of are V2 and frontal cortex. Similar to area V2, Ox7 treatment completely abolished the ORM enhancement mediated by RGS14₄₁₄ gene treatment in perirhinal cortex. However, Ox7 treatment showed no effect on ORM enhancement when administrated in either frontal (Fr) cortex or area V2 (V2) or in both areas together. Injections shown in drawings on top of graph indicate RGS treatment sites and crosses indicate Ox7 treatment sites in each case. Their corresponding results are shown just beneath of them. Number (n) of rats is indicated beneath bars. * shows significant intra-group differences and ◆ shows significant intergroup differences ($p \leq 0.05$).

3.2.3 Independence of frontal cortex in ORM

Once memory enhancer effect of RGS14 gene treatment in frontal cortex was confirmed (RGS14 group 0.745 ± 0.048 versus control vehicle group 0.450 ± 0.040 ; $p < 0.001$), neurons of frontal cortex implicated in ORM enhancement were eliminated by Ox7-SAP administration. This lesion in frontal cortex completely abolished the RGS14-mediated memory enhancer effect (0.479 ± 0.022 , $p < 0.001$) (figure 41). However, lesions in perirhinal cortex (0.693 ± 0.020), area V2 (0.710 ± 0.038) or perirhinal cortex + area V2 (0.731 ± 0.061), did not generate any effect on memory enhancer effect of RGS14 ($p \leq 0.05$).

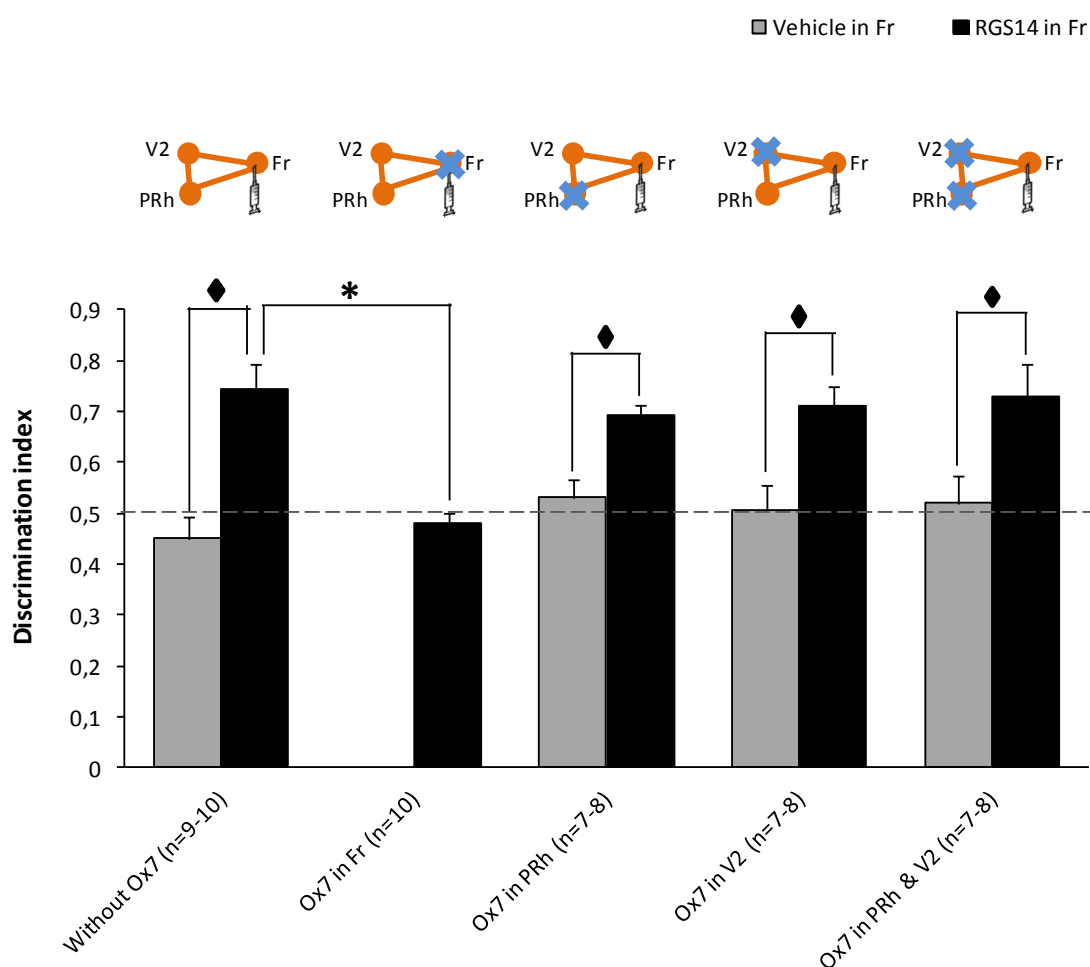


Figure 41. RGS14₄₁₄ gene treatment-mediated ORM enhancement in frontal cortex is independent of area V2 and perirhinal cortices. ORM enhancement associated to RGS14₄₁₄ gene treatment in frontal cortex was abolished by Ox7 administration in the same area, however, Ox7 administration in perirhinal (PRh) cortex and area V2 (V2) individually or together in both areas produces no effect on ORM enhancement. Injections shown in drawings on top of graph indicate RGS treatment sites and crosses indicate Ox7 treatment sites in each case. Their corresponding results are shown just beneath of them. Number of rats (n) is indicated beneath bars. * shows significant intra-group differences and ◆ shows significant intergroup differences ($p \leq 0.05$).

V. Discussion

The ongoing quest for finding treatment against memory loss seen in aging and in many neurological and neurodegenerative diseases, so far has been unsuccessful. Meanwhile, aging population (over 65 years of age) who broadly suffer from memory deficit is projected to hit 35 % of the population within 3 decades in developed countries. Therefore, there is a growing need for finding cure of this mental disease to curb the immense social and economic burden yet to come. The study of memory enhancement seems to hold the potential for developing strategies to treat memory dysfunctions ((Lee & Silva 2009; Stern & Alberini 2013). Accordingly, in an effort to find remedy, our laboratory discovered a robust memory enhancer RGS14₄₁₄, which promoted conversion of short-term ORM expected to last for 45 min into long-term memory that could be traced even after many months (Lopez-Aranda et al 2009). In addition, it augmented the capacity to hold multiple object information in memory more than 3 fold, and the effect of a single treatment of this persisted for rat's lifetime (Navarro-Lobato 2015). Therefore, we planted here to test the memory enhancer effect of RGS14₄₁₄ in recovery of ORM loss in rodent models, with the idea to validate potential of RGS14₄₁₄ gene therapy against memory loss. In addition, we have explored into underlying causes of RGS-mediated memory enhancement.

1 Recovery of an episodic memory loss in aging and AD

Considering that episodic memory is mainly affected in aging and in many brain diseases, and that ORM is one of the most studied examples of episodic memory, we chose to work with ORM as an indicator of episodic memory. To demonstrate the effect of RGS14₄₁₄ in recuperation of ORM loss, we have used two most representative conditions of memory loss: normal aging and AD, where substantial decline in episodic memory has consistently been reported (Didic et al 2011; Drag & Bieliauskas 2010; Dubois et al 2007; Gallagher & Koh 2011; Kitazawa et al 2012; Nyberg et al 2012; Salmon 2012; Shing et al 2010). We found that control rats of 3 months of age were able to retain the information of an object after a delay of 45 min; however, when these rats reached to 18 months of age, they were unable to remember the same information. The memory-deficient 18 months old rats were then treated with RGS14₄₁₄ gene. This treatment induced a full recovery in ORM loss of these ORM-deficient animals. In contrast, 2 months old AD-mice showed normal ORM status, which was same level as wild type control mice. However, AD-mice showed a significant ORM deficit at the age of 4 months. Similar to aged rats, a treatment of these memory-deficient mice with

RGS14₄₁₄ gene led to full recuperation of ORM loss. Altogether results from both aged rats and AD-mice show that RGS14₄₁₄ gene therapy was not only sufficient to recuperate ORM loss, but also was ample for maintaining the elevated ORM level for long time. Though our results are at preclinical stage, they suggest that RGS14₄₁₄ gene treatment in area V2 could serve as a therapeutic approach against episodic memory loss.

2 Effect of RGS14 is mediated through GluR2

With the idea to understand how RGS14₄₁₄-mediated memory enhancement is produced in normal conditions and to shed light on memory enhancer pathways in brain, a variety of inhibitors and antagonists were used for targeting multiple receptors and molecules that are shown to be implicated in memory processing. We found that, AMPA/Kainate receptors, CaMKII and PARP-1 are involved in RGS-mediated ORM enhancement, because their inhibition reverted the memory enhancement. However, in contrast, other receptors and molecules, such as NMDARs, mGluR1a, MKK, and PKM ζ , do not intervene in RGS-mediated ORM enhancement since their inhibition showed no effect at all.

Recent studies have demonstrated a relationship of AMPA receptors with CaMKII and PARP-1. It has been shown that CaMKII regulates the trafficking of GluA2-containing receptors to the cell surface (Lu et al 2014). However, activation of nuclear enzyme PARP-1 caused a change in GluA1 and GluA2 AMPA receptors expression and therefore, it might produce an alteration in synaptic functions of glutamate receptors (Gerace et al 2014; Gerace et al 2015).

Nevertheless, with the consideration of involvement in memory formation (Griffiths et al 2008; Malkova et al 2015; Winters & Bussey 2005) and in synaptic plasticity (Bassani et al 2013; Chater & Goda 2014; Fleming & England 2010), we decided to focus on AMPA receptors as a key mechanism for RGS14 memory enhancement and leaving PARP-1 and CaMKII for future study. mRNA expression level analysis of all AMPA receptor (GluR1-GluR4) genes indicated that there was a noticeable increase in GluR2 mRNA levels in RGS14-treated rats. This observation was further confirmed by analysis in protein level. To see whether high protein level in RGS-treated animals is reflection of a dynamic participation of this AMPA receptor subunit during ORM processing, we analyzed GluR2 protein levels at 20, 40, 60 min and 24 h after exposure to an object (figure 42). RGS14₄₁₄ gene treatment led

to a progressive increase in GluR2 protein expression, reaching highest level after 60 min of exposure, a time period required for conversion of short-term ORM into long-term memory in our laboratory set up (Lopez-Aranda et al 2009). We have observed that when an object is exposed to normal rats for 3 min, they could retain the information in brain for 45 min (short-term) and not for 60 min. However, RGS-treated rats were able to retain the same information for 24 h or longer (long-term). Therefore, highest expression of GluR2 subunit seen at 60 min supports the idea that this protein might be a key in ORM enhancement and conversion to long-term memory in RGS-animals. In contrast to RGS, vehicle-treated animals showed highest GluR2 expression at 20 min and not at 60 min. Instead, there was a progressive decrease apart from 20 min. This observation goes in line to our argument that GluR2 overexpression and maintenance caused by RGS14 gene treatment might be the trigger for ORM enhancement and thus, can serve as an important target site for developing therapy for memory enhancement.

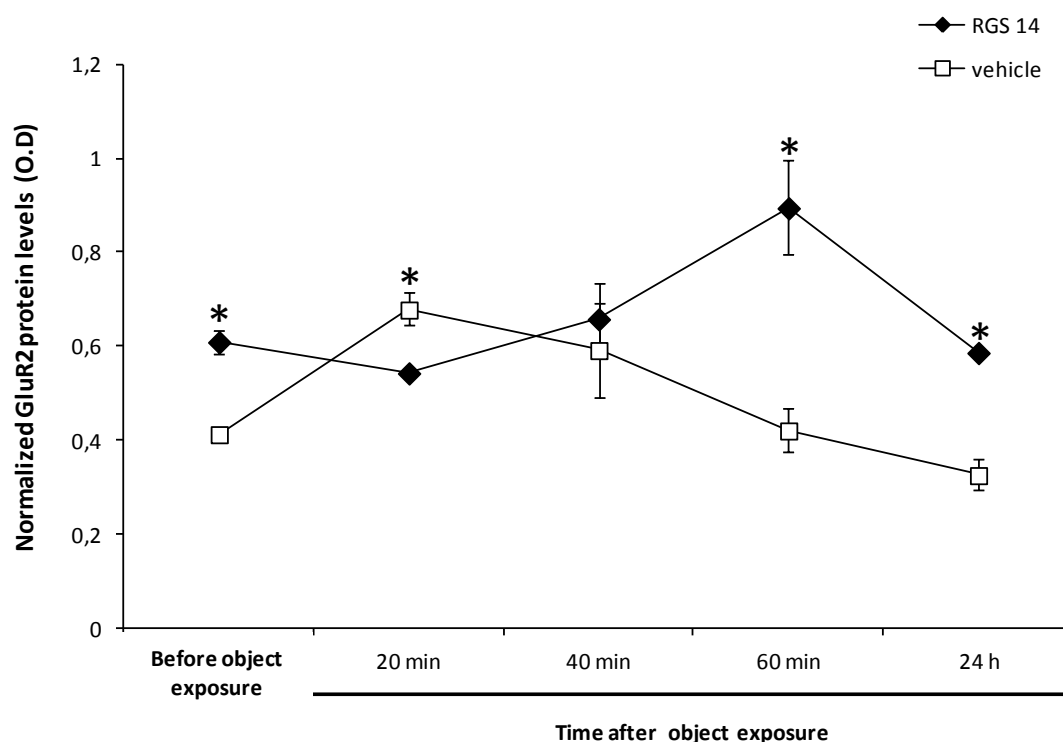


Figure 42. A dynamic expression of GluR2 during ORM processing. RGS-animals showed noticeable increase in GluR2 protein levels. However after exposing same animals to two identical objects, a progressive increase was observed in the level of this protein which reached to highest at 60 min of the object exposure. In contrast, vehicle-treated control animals showed highest expression at 20 min of object exposure. Data were collected from 3 experiments. * shows significant intergroup differences ($p \leq 0.05$). O.D: optical density.

3 RGS14 does not facilitate the Hebbian synaptic plasticity

Knowing the fact that RGS14 gene treatment upregulates GluR2 and the role of GluR2 in regulation of synaptic plasticity (Asrar & Jia 2013; Haganir & Nicoll 2013; Isaac et al 2007), we next wanted to explore how high level of this protein in RGS-animals will effect on the different forms of synaptic plasticity, such as LTP, LTD and depotentiation. However, in literature, electrophysiological studies of synaptic plasticity that have a well-defined relation to ORM, are primarily done in perirhinal cortex and none in area V2. Therefore, we went on to test the memory enhancer effect of RGS14₄₁₄ gene treatment in perirhinal cortex, with the idea to validate this area for electrophysiological studies. The memory enhancer effect of RGS14 in this brain area was similar to as previously observed in area V2. We found no difference in both areas. This result was no surprise because considering that perirhinal cortex is one of the principal brain areas that participate in neuronal circuit responsible for ORM (Brown & Aggleton 2001; Kim et al 2014; Lech & Suchan 2013; Martin et al 2013; Ranganath & Ritchey 2012; Warburton & Brown 2010; Watson & Lee 2013), and cellular mediation of RGS14 effect should not discriminate between area V2 and perirhinal cortex neurons. A study of *in vitro* extracellular field recordings in perirhinal cortex of brain slices obtained from RGS-treated rats showed no effect on both LTP and LTD when high level of stimulation was applied (100 Hz for LTP and 50 μ M carbachol for LTD). However, low level of stimulation (20 Hz for LTP and 20 μ M carbachol for LTD) reduced their maintenance for long-term. In addition, RGS14 treatment blocked the induction of depotentiation generated by low frequency stimulation of 1 Hz, and once stopped the application of this stimulation, it went back to same LTP level as was prior to depotentiation. These results support the notion that RGS 14 treatment does not favor Hebbian synaptic plasticity, not even in the presence of higher concentration of GluR2 protein. Despite the fact that underlying mechanism of this lack in plasticity is yet to be elucidated, we hypothesize that a decrease in the calcium influx through RGS-mediated blockage of L-type calcium channel could trigger impairments seen in Hebbian plasticity. Because RGS14₄₁₄ reduces intracellular Ca^{2+} levels by blocking L-type calcium channels (Martin-Montanez et al 2010) and intracellular Ca^{2+} levels are well-documented for their direct implication in different forms of Hebbian plasticity (Baker et al 2013).

Interestingly, in addition to the fact that the administration of L-type calcium channel antagonists has been demonstrated to improve spatial memory in rodents (Levy et al 1991;

Quartermain et al 2001), several studies have reported a link between calcium channel antagonists and rescue of memory loss. Nimodipine, an L-type calcium channel blocker, prevents age-associated memory deficits in aged rodents (Batuecas et al 1998; Hopp et al 2014; Ingram et al 1994; Moyer et al 1992; Thompson et al 1990) as well as memory loss deficits caused by alcohol or morphine withdrawal in rodents (Brooks et al 2008; Brooks et al 2002; Vaseghi et al 2014; Vaseghi et al 2012). Furthermore, epidemiological evidence shows that L-type calcium channel antagonism is associated with reduced prevalence of Alzheimer's disease (AD) (Anekonda & Quinn 2011; Lopez-Arrieta & Birks 2002) and AD patients given the L-type calcium channel antagonist nimodipine showed improvements over placebo-treated patients on several cognitive measures (Tollefson 1990).

It should be pointed that a lack in Hebbian plasticity in RGS-animals does not mean that there should not be enhancement in ORM in these animals. Instead, there is ample evidence in literature showing memory enhancement independent to Hebbian plasticity. It is becoming increasingly evident that memory is also reliant on non-Hebbian forms of plasticity, such as intrinsic plasticity and synaptic scaling (Baker-Andresen et al 2013; Nelson & Turrigiano 2008). For instance, RGS14-mediated memory enhancement could be explained by a facilitation of synaptic scaling, the best understood form of homeostatic plasticity at central excitatory synapses (Davis 2006; Turrigiano 2008; Turrigiano & Nelson 2004), that has now been shown in a variety of central neurons both *in vitro* and *in vivo*, including neocortical and hippocampal pyramidal neurons and spinal neurons (Chandler & Grossberg 2012; Desai et al 2002; Goel & Lee 2007; Kim & Tsien 2008; Knogler et al 2010; O'Brien et al 1998; Stellwagen & Malenka 2006; Turrigiano et al 1998). Though, we have no data showing the involvement of non-Hebbian plasticity or intracellular Ca^{2+} levels, this laboratory continues to explore this route for possible explanation of ORM enhancement in RGS-treated rats.

4 Independent brain areas can promote RGS-mediated recovery of ORM loss

The most surprising part of our results showing the recovery of ORM loss in rodent models was how activation of area V2, a brain area never been demonstrated to be involved in memory dysfunction, is able to correct memory deficit that might have been originated by two distinct mechanisms in both models. It is thought that ORM in brain is processed through specialized neuronal circuit, which is formed by the participation of multiple brain areas.

Within this neuronal circuit, the role of perirhinal cortex (Brown & Aggleton 2001; Kim et al 2014; Lech & Suchan 2013; Martin et al 2013; Ranganath & Ritchey 2012; Warburton & Brown 2010; Watson & Lee 2013) and frontal cortex (Banks et al 2012; Swick & Knight 1999; Warburton & Brown 2010) in object recognition have been well studied. And now, our laboratory has discovered that area V2 (Lopez-Aranda et al 2006) play an important role in ORM processing. Therefore, we thought that if activation of area V2 by RGS treatment can recuperate ORM loss, same treatment either in frontal cortex or in perirhinal cortex should produce same effect on memory. To simulate ORM deficit seen in many brain diseases and aging conditions, we performed lesion either in area V2, frontal cortex or perirhinal cortex. Lesions in any one of the three areas produced substantial damage and significant loss in ORM. Further, a treatment with RGS14₄₁₄ in one of the non-lesion areas of these three brain areas restored the memory to normal level. The activity associated with recuperation in memory loss by RGS14 treatment was to an extent that it was ample even when two of the three brain areas were damaged by lesion. Our results of full recuperation of memory loss in rats with lesion suggest that area V2, frontal and perirhinal cortices are independently adequate for treatment of memory loss in spite of where the primary cause is localized in whole brain. Considering that lesion produced here was with the use of Ox7-SAP, which selectively eliminates neurons and does not affect other structures and cell types, including passing by fibers, the information could still pass through the damaged brain areas. In light of this observation, our results indicate that RGS-mediated neuronal activation contributes to stabilization and subsequently normalization in dysfunctional ORM circuit that runs through various brain areas.

5 Mechanism of RGS-mediated memory enhancement and recovery of ORM loss

Mechanism that drives a recuperation of ORM loss in both rodent models and in rats with lesion seems to be associated with the activation of GluR2 activity. A down-regulation in GluR2 levels has been reported in normal aging (Liu et al 2008; Yu et al 2011) and in Alzheimer's disease (Resende et al 2007). This decrease in GluR2 subunit of glutamate AMPA receptors was thought to be responsible for significant rise in cytosolic Ca²⁺ concentration, which as a consequence led to dendritic dystrophy and impairment in synaptic function (Hof et al 2002; Resende et al 2007). Normalization in GluR2 levels after treatment

with RGS14₄₁₄ might cause a decrease in cytosolic Ca²⁺ concentration as seen previously (Martin-Montanez et al 2010). Apart from work of current thesis, this laboratory has discovered that RGS14 gene treatment produces a robust neuronal arborization (Navarro-Lobato 2015). Therefore, it is argued that an increase in neuronal connections might not only promote restructuration of the circuit responsible for RGS-mediated ORM enhancement, but could also facilitate the flow of information during ORM processing. Loss of AMPA receptors from the postsynaptic neurons resulted in reduced dendritic branch stability (Haas et al 2006), whereas overexpression of AMPA receptor subunits led to increased numbers of branch segments (Chen et al 2009; Prithviraj et al 2008). Moreover, GluR2 overexpression increased spine density in hippocampus (Passafaro et al 2003) and dendritic length in developing cortical neurons in rat embryos (Chen et al 2009), whereas GluR2 downregulation caused a loss of dendritic branch segments in the hippocampus (Passafaro et al 2003) and reduced the dendritic arborization of developing spinal motoneurons in chicken embryos (Yoon et al 2012).

Though the complete mechanistic map of RGS14-mediated memory enhancement and recuperation of memory loss has long way to go, results from current work suggest that GluR2 overexpression could be the trigger for an increased dendritic arborization promoting the appearance of new synapses and therefore, causing a restructuration of the circuit responsible for RGS14-mediated ORM enhancement. And most importantly, we have demonstrated that an episodic memory (ORM) loss can be recovered by RGS14₄₁₄ gene treatment either in area V2, frontal cortex or perirhinal cortex, and this recuperation is independent to where origination of memory loss is localized in brain. Thus, a treatment is feasible without knowing the area or areas of brain implicated in memory loss. Current work provides a strategic platform for treatment of memory loss observed in many neurological and neurodegenerative diseases and in normal aging.

VI. Conclusions

1. RGS14₄₁₄ gene treatment not only led to full recovery of an episodic memory loss in rodent models of normal aging and Alzheimer's disease, but also aided in maintenance of the elevated ORM levels for long time.
2. GluR2, an AMPA receptor subunit, is a key in RGS14-mediated ORM enhancement. In addition to upregulated level, GluR2 subunit showed a dynamic participation in conversion of short-term ORM into long-term memory.
3. RGS14₄₁₄ gene treatment did not favor Hebbian synaptic plasticity, which included LTP, muscarinic receptor-dependent LTD, and depotentiation. Though underlying cause of this lack in plasticity is yet to be elucidated, we believe that a decrease in calcium influx through RGS14-mediated blockage of L-type calcium channel could trigger the impairments seen in Hebbian plasticity, and that RGS14-mediated ORM enhancement could be reliant on non-Hebbian forms of plasticity.
4. Area V2, frontal cortex and perirhinal cortex, areas that participate in brain circuit responsible for ORM processing, are not dependent on each other in RGS14-mediated memory enhancement. This independency of these brain areas in memory enhancement suggests that they are individually adequate for treatment of memory loss, in spite of where the primary cause is localized in brain.
5. The results of memory loss recovery in rodent models and of memory enhancement in lesioned rats demonstrate that RGS14₄₁₄ gene therapy might be a viable strategy for the treatment of memory loss in patients.

VII. References

- Abe H, Ishida Y, Iwasaki T. 2004. Perirhinal N-methyl-D-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. *Neurosci Lett* 356:191-4
- Abraham WC, Robins A. 2005. Memory retention--the synaptic stability versus plasticity dilemma. *Trends Neurosci* 28:73-8
- Acosta-Cabronero J, Williams GB, Pengas G, Nestor PJ. 2010. Absolute diffusivities define the landscape of white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Brain* 133:529-39
- Agster KL, Burwell RD. 2013. Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Behav Brain Res* 254:50-64
- Aicardi G, Argilli E, Cappello S, Santi S, Riccio M, et al. 2004. Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15788-92
- Akinleye A, Furqan M, Mukhi N, Ravella P, Liu D. 2013. MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J Hematol Oncol* 6:27
- Albert PR, Robillard L. 2002. G protein specificity: traffic direction required. *Cell Signal* 14:407-18
- Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. 2004. The PARP superfamily. *Bioessays* 26:882-93
- Anderson WW, Collingridge GL. 2007. Capabilities of the WinLTP data acquisition program extending beyond basic LTP experimental functions. *J Neurosci Methods* 162:346-56
- Anderson WW, Fitzjohn SM, Collingridge GL. 2012. Automated multi-slice extracellular and patch-clamp experiments using the WinLTP data acquisition system with automated perfusion control. *J Neurosci Methods* 207:148-60
- Anekonda TS, Quinn JF. 2011. Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine. *Biochim Biophys Acta* 1812:1584-90
- Antunes M, Biala G. 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13:93-110
- Apergis-Schoute AM, Debiec J, Doyere V, LeDoux JE, Schafe GE. 2005. Auditory fear conditioning and long-term potentiation in the lateral amygdala require ERK/MAP kinase signaling in the auditory thalamus: a role for presynaptic plasticity in the fear system. *J Neurosci* 25:5730-9
- Asrar S, Jia Z. 2013. Molecular mechanisms coordinating functional and morphological plasticity at the synapse: role of GluA2/N-cadherin interaction-mediated actin signaling in mGluR-dependent LTD. *Cell Signal* 25:397-402
- Baker-Andresen D, Ratnu VS, Bredy TW. 2013. Dynamic DNA methylation: a prime candidate for genomic metaplasticity and behavioral adaptation. *Trends Neurosci* 36:3-13
- Baker KD, Edwards TM, Rickard NS. 2013. The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 37:1211-39
- Banks PJ, Bashir ZI, Brown MW. 2012. Recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal and prefrontal cortices. *Hippocampus* 22:2012-31
- Banks PJ, Warburton EC, Brown MW, Bashir ZI. 2014. Mechanisms of synaptic plasticity and recognition memory in the perirhinal cortex. *Prog Mol Biol Transl Sci* 122:193-209
- Barker GR, Bashir ZI, Brown MW, Warburton EC. 2006. A temporally distinct role for group I and group II metabotropic glutamate receptors in object recognition memory. *Learn Mem* 13:178-86
- Barnes CA, Rao G, Houston FP. 2000. LTP induction threshold change in old rats at the perforant path--granule cell synapse. *Neurobiol Aging* 21:613-20
- Barnes CA, Rao G, McNaughton BL. 1996. Functional integrity of NMDA-dependent LTP induction mechanisms across the lifespan of F-344 rats. *Learn Mem* 3:124-37
- Bassani S, Folci A, Zapata J, Passafaro M. 2013. AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cell Mol Life Sci* 70:4411-30
- Batuecas A, Pereira R, Centeno C, Pulido JA, Hernandez M, et al. 1998. Effects of chronic nimodipine on working memory of old rats in relation to defects in synaptosomal calcium homeostasis. *Eur J Pharmacol* 350:141-50
- Bauer EP, Schafe GE, LeDoux JE. 2002. NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22:5239-49
- Behe P, Stern P, Wyllie DJ, Nassar M, Schoepfer R, Colquhoun D. 1995. Determination of NMDA NR1 subunit copy number in recombinant NMDA receptors. *Proc Biol Sci* 262:205-13

- Beneyto M, Meador-Woodruff JH. 2004. Expression of transcripts encoding AMPA receptor subunits and associated postsynaptic proteins in the macaque brain. *J Comp Neurol* 468:530-54
- Berger SM, Bartsch D. 2014. The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function. *Cell Tissue Res* 357:463-76
- Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y. 2000. The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J Neurosci* 20:7017-23
- Bilkey DK. 1996. Long-term potentiation in the in vitro perirhinal cortex displays associative properties. *Brain Res* 733:297-300
- Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-9
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. 1987. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237:527-32
- Borrioni AM, Fichtenholtz H, Woodside BL, Teyler TJ. 2000. Role of voltage-dependent calcium channel long-term potentiation (LTP) and NMDA LTP in spatial memory. *J Neurosci* 20:9272-6
- Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-59
- Braak H, Braak E. 1995. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 16:271-8; discussion 8-84
- Brooks SP, Croft AP, Norman G, Shaw SG, Little HJ. 2008. Nimodipine prior to alcohol withdrawal prevents memory deficits during the abstinence phase. *Neuroscience* 157:376-84
- Brooks SP, Hennebry G, McAlpin GP, Norman G, Little HJ. 2002. Nimodipine prevents the effects of ethanol in tests of memory. *Neuropharmacology* 42:577-85
- Brown MW, Aggleton JP. 2001. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* 2:51-61
- Buckner RL. 2004. Memory and executive function in aging and AD: multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate. *Neuron* 44:195-208
- Burke SN, Barnes CA. 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7:30-40
- Burwell RD. 2001. Borders and cytoarchitecture of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *J Comp Neurol* 437:17-41
- Burwell RD, Amaral DG. 1998a. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* 398:179-205
- Burwell RD, Amaral DG. 1998b. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 391:293-321
- Bussey TJ, Saksida LM. 2005. Object memory and perception in the medial temporal lobe: an alternative approach. *Curr Opin Neurobiol* 15:730-7
- Bussey TJ, Saksida LM. 2007. Memory, perception, and the ventral visual-perirhinal-hippocampal stream: thinking outside of the boxes. *Hippocampus* 17:898-908
- Canto CB, Wouterlood FG, Witter MP. 2008. What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plast* 2008:381243
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. 2005. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57:411-25
- Cazakoff BN, Howland JG. 2011. AMPA receptor endocytosis in rat perirhinal cortex underlies retrieval of object memory. *Learn Mem* 18:688-92
- Cetin A, Komai S, Eliava M, Seeburg PH, Osten P. 2006. Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nat Protoc* 1:3166-73
- Citri A, Malenka RC. 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18-41
- Cohen-Armon M. 2007. PARP-1 activation in the ERK signaling pathway. *Trends Pharmacol Sci* 28:556-60
- Cohen-Armon M, Visochek L, Katzoff A, Levitan D, Susswein AJ, et al. 2004. Long-term memory requires polyADP-ribosylation. *Science* 304:1820-2

- Cohen-Armon M, Visochek L, Rozensal D, Kalal A, Geistrikh I, et al. 2007. DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol Cell* 25:297-308
- Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT. 2004. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:952-62
- Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT. 2010. Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 11:459-73
- Conn PJ, Pin JP. 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-37
- Coultrap SJ, Bayer KU. 2012. CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci* 35:607-18
- Cull-Candy S, Kelly L, Farrant M. 2006. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 16:288-97
- Chandler B, Grossberg S. 2012. Joining distributed pattern processing and homeostatic plasticity in recurrent on-center off-surround shunting networks: noise, saturation, short-term memory, synaptic scaling, and BDNF. *Neural Netw* 25:21-9
- Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, et al. 1999. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2:271-6
- Chater TE, Goda Y. 2014. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Front Cell Neurosci* 8:401
- Chen W, Prithviraj R, Mahnke AH, McGloin KE, Tan JW, et al. 2009. AMPA glutamate receptor subunits 1 and 2 regulate dendrite complexity and spine motility in neurons of the developing neocortex. *Neuroscience* 159:172-82
- Cheng D, Hoogenraad CC, Rush J, Ramm E, Schlager MA, et al. 2006. Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol Cell Proteomics* 5:1158-70
- Cheng L, Yin WJ, Zhang JF, Qi JS. 2009. Amyloid beta-protein fragments 25-35 and 31-35 potentiate long-term depression in hippocampal CA1 region of rats in vivo. *Synapse* 63:206-14
- Chittajallu R, Alford S, Collingridge GL. 1998. Ca²⁺ and synaptic plasticity. *Cell Calcium* 24:377-85
- Cho H, Kozasa T, Takekoshi K, De Gunzburg J, Kehrl JH. 2000a. RGS14, a GTPase-activating protein for G α , attenuates G α - and G13 α -mediated signaling pathways. *Mol Pharmacol* 58:569-76
- Cho K, Kemp N, Noel J, Aggleton JP, Brown MW, Bashir ZI. 2000b. A new form of long-term depression in the perirhinal cortex. *Nat Neurosci* 3:150-6
- Chong SA, Benilova I, Shaban H, De Strooper B, Devijver H, et al. 2011. Synaptic dysfunction in hippocampus of transgenic mouse models of Alzheimer's disease: a multi-electrode array study. *Neurobiol Dis* 44:284-91
- Chosewood LC, Wilson DE, Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), National Institutes of Health (U.S.). 2009. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. Washington, D.C.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. xxii, 415 p. pp.
- Davis GW. 2006. Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design. *Annu Rev Neurosci* 29:307-23
- Davis S, Butcher SP, Morris RG. 1992. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J Neurosci* 12:21-34
- Davis S, Laroche S. 2006. Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav* 5 Suppl 2:61-72
- De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG. 2000. The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:235-71
- Dere E, Pause BM, Pietrowsky R. 2010. Emotion and episodic memory in neuropsychiatric disorders. *Behav Brain Res* 215:162-71
- Desai NS, Cudmore RH, Nelson SB, Turrigiano GG. 2002. Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex. *Nat Neurosci* 5:783-9

- Deupree DL, Turner DA, Watters CL. 1991. Spatial performance correlates with in vitro potentiation in young and aged Fischer 344 rats. *Brain Res* 554:1-9
- Diana G, Domenici MR, Loizzo A, Scotti de Carolis A, Sagratella S. 1994a. Age and strain differences in rat place learning and hippocampal dentate gyrus frequency-potentiation. *Neurosci Lett* 171:113-6
- Diana G, Scotti de Carolis A, Frank C, Domenici MR, Sagratella S. 1994b. Selective reduction of hippocampal dentate frequency potentiation in aged rats with impaired place learning. *Brain Res Bull* 35:107-11
- Diana RA, Yonelinas AP, Ranganath C. 2007. Imaging recollection and familiarity in the medial temporal lobe: a three-component model. *Trends Cogn Sci* 11:379-86
- Didic M, Barbeau EJ, Felician O, Tramon E, Guedj E, et al. 2011. Which memory system is impaired first in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 27:11-22
- Dieguez D, Jr., Barea-Rodriguez EJ. 2004. Aging impairs the late phase of long-term potentiation at the medial perforant path-CA3 synapse in awake rats. *Synapse* 52:53-61
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61
- Donaldson W. 1996. The role of decision processes in remembering and knowing. *Mem Cognit* 24:523-33
- Drag LL, Bieliauskas LA. 2010. Contemporary review 2009: cognitive aging. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23:75-93
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, et al. 2007. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6:734-46
- Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C. 2007. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* 30:123-52
- Elgersma Y, Sweatt JD, Giese KP. 2004. Mouse genetic approaches to investigating calcium/calmodulin-dependent protein kinase II function in plasticity and cognition. *J Neurosci* 24:8410-5
- Ennaceur A, Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47-59
- Escribano L, Simon AM, Perez-Mediavilla A, Salazar-Colocho P, Del Rio J, Frechilla D. 2009. Rosiglitazone reverses memory decline and hippocampal glucocorticoid receptor down-regulation in an Alzheimer's disease mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 379:406-10
- Evans PR, Lee SE, Smith Y, Hepler JR. 2014. Postnatal developmental expression of regulator of G protein signaling 14 (RGS14) in the mouse brain. *J Comp Neurol* 522:186-203
- Feldman DE. 2009. Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annu Rev Neurosci* 32:33-55
- Fitzjohn SM, Kuenzi F, Morton RA, Rosahl TW, Lewis H, et al. 2010. A study of long-term potentiation in transgenic mice over-expressing mutant forms of both amyloid precursor protein and presenilin-1. *Mol Brain* 3:21
- Fjell AM, Walhovd KB, Fennema-Notestine C, McEvoy LK, Hagler DJ, et al. 2009. One-year brain atrophy evident in healthy aging. *J Neurosci* 29:15223-31
- Fjell AM, Westlye LT, Grydeland H, Amlie I, Espeseth T, et al. 2014. Accelerating cortical thinning: unique to dementia or universal in aging? *Cereb Cortex* 24:919-34
- Fleming JJ, England PM. 2010. AMPA receptors and synaptic plasticity: a chemist's perspective. *Nat Chem Biol* 6:89-97
- Fontan-Lozano A, Suarez-Pereira I, Horrillo A, del-Pozo-Martin Y, Hmadcha A, Carrion AM. 2010. Histone H1 poly[ADP]-ribosylation regulates the chromatin alterations required for learning consolidation. *J Neurosci* 30:13305-13
- Foster TC. 2007. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* 6:319-25
- Foster TC, Norris CM. 1997. Age-associated changes in Ca(2+)-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 7:602-12
- Furtak SC, Wei SM, Agster KL, Burwell RD. 2007. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: the perirhinal and postrhinal cortices. *Hippocampus* 17:709-22
- Gaffan D. 2002. Against memory systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:1111-21

- Gallagher M, Koh MT. 2011. Episodic memory on the path to Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 21:929-34
- Gerace E, Masi A, Resta F, Felici R, Landucci E, et al. 2014. PARP-1 activation causes neuronal death in the hippocampal CA1 region by increasing the expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. *Neurobiol Dis* 70:43-52
- Gerace E, Pellegrini-Giampietro DE, Moroni F, Mannaioni G. 2015. Poly(ADP-Ribose)Polymerase 1 (PARP-1) Activation and Ca(2+) Permeable alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid (AMPA) Channels in Post-Ischemic Brain Damage: New Therapeutic Opportunities? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 14:636-46
- Gertz HJ, Xuereb J, Huppert F, Brayne C, McGee MA, et al. 1998. Examination of the validity of the hierarchical model of neuropathological staging in normal aging and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 95:154-8
- Gilman AG. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56:615-49
- Goel A, Lee HK. 2007. Persistence of experience-induced homeostatic synaptic plasticity through adulthood in superficial layers of mouse visual cortex. *J Neurosci* 27:6692-700
- Goldberg S, Visochek L, Giladi E, Gozes I, Cohen-Armon M. 2009. PolyADP-ribosylation is required for long-term memory formation in mammals. *J Neurochem* 111:72-9
- Gong B, Vitolo OV, Trinchese F, Liu S, Shelanski M, Arancio O. 2004. Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. *J Clin Invest* 114:1624-34
- Grafstein-Dunn E, Young KH, Cockett MI, Khawaja XZ. 2001. Regional distribution of regulators of G-protein signaling (RGS) 1, 2, 13, 14, 16, and GAIP messenger ribonucleic acids by in situ hybridization in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 88:113-23
- Greger IH, Khatri L, Kong X, Ziff EB. 2003. AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* 40:763-74
- Griffiths S, Scott H, Glover C, Bienemann A, Ghorbel MT, et al. 2008. Expression of long-term depression underlies visual recognition memory. *Neuron* 58:186-94
- Gureviciene I, Ikonen S, Gurevicius K, Sarkaki A, van Groen T, et al. 2004. Normal induction but accelerated decay of LTP in APP + PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 15:188-95
- Haas K, Li J, Cline HT. 2006. AMPA receptors regulate experience-dependent dendritic arbor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12127-31
- Haist F, Shimamura AP, Squire LR. 1992. On the relationship between recall and recognition memory. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn* 18:691-702
- Hamm HE. 1998. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273:669-72
- Hardt O, Miguez PV, Hastings M, Wong J, Nader K. 2010. PKMzeta maintains 1-day- and 6-day-old long-term object location but not object identity memory in dorsal hippocampus. *Hippocampus* 20:691-5
- Harris JA, Devidze N, Halabisky B, Lo I, Thwin MT, et al. 2010. Many neuronal and behavioral impairments in transgenic mouse models of Alzheimer's disease are independent of caspase cleavage of the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 30:372-81
- Head D, Snyder AZ, Girton LE, Morris JC, Buckner RL. 2005. Frontal-hippocampal double dissociation between normal aging and Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 15:732-9
- Hebert AE, Dash PK. 2002. Extracellular signal-regulated kinase activity in the entorhinal cortex is necessary for long-term spatial memory. *Learn Mem* 9:156-66
- Hepler JR, Gilman AG. 1992. G proteins. *Trends Biochem Sci* 17:383-7
- Hernandez AI, Blace N, Crary JF, Serrano PA, Leitges M, et al. 2003. Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. *J Biol Chem* 278:40305-16
- Hof PR, Duan H, Page TL, Einstein M, Wicinski B, et al. 2002. Age-related changes in GluR2 and NMDAR1 glutamate receptor subunit protein immunoreactivity in corticocortically projecting neurons in macaque and patas monkeys. *Brain Res* 928:175-86
- Hollinger S, Hepler JR. 2002. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 54:527-59

- Hollinger S, Taylor JB, Goldman EH, Hepler JR. 2001. RGS14 is a bifunctional regulator of Galphai/o activity that exists in multiple populations in brain. *J Neurochem* 79:941-9
- Hollmann M, Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108
- Hopp SC, D'Angelo HM, Royer SE, Kaercher RM, Adzovic L, Wenk GL. 2014. Differential rescue of spatial memory deficits in aged rats by L-type voltage-dependent calcium channel and ryanodine receptor antagonism. *Neuroscience* 280:10-8
- Huganir RL, Nicoll RA. 2013. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron* 80:704-17
- Ichim CV, Wells RA. 2011. Generation of high-titer viral preparations by concentration using successive rounds of ultracentrifugation. *J Transl Med* 9:137
- Ingram DK, Joseph JA, Spangler EL, Roberts D, Hengemihle J, Fanelli RJ. 1994. Chronic nimodipine treatment in aged rats: analysis of motor and cognitive effects and muscarinic-induced striatal dopamine release. *Neurobiol Aging* 15:55-61
- Insausti R, Herrero MT, Witter MP. 1997. Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus* 7:146-83
- Irvine EE, von Herten LS, Plattner F, Giese KP. 2006. alphaCaMKII autophosphorylation: a fast track to memory. *Trends Neurosci* 29:459-65
- Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. 2007. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* 54:859-71
- Ju BG, Solum D, Song EJ, Lee KJ, Rose DW, et al. 2004. Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase IIdelta-dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell* 119:815-29
- Kajiwara R, Takashima I, Mimura Y, Witter MP, Iijima T. 2003. Amygdala input promotes spread of excitatory neural activity from perirhinal cortex to the entorhinal-hippocampal circuit. *J Neurophysiol* 89:2176-84
- Kealy J, Commins S. 2011. The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Prog Neurobiol* 93:522-48
- Keinanen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, et al. 1990. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249:556-60
- Kelly A, Laroche S, Davis S. 2003. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* 23:5354-60
- Kemp N, Bashir ZI. 2001. Long-term depression: a cascade of induction and expression mechanisms. *Prog Neurobiol* 65:339-65
- Killiany RJ, Hyman BT, Gomez-Isla T, Moss MB, Kikinis R, et al. 2002. MRI measures of entorhinal cortex vs hippocampus in preclinical AD. *Neurology* 58:1188-96
- Kim J, Tsien RW. 2008. Synapse-specific adaptations to inactivity in hippocampal circuits achieve homeostatic gain control while dampening network reverberation. *Neuron* 58:925-37
- Kim JH, Anwyl R, Suh YH, Djamgoz MB, Rowan MJ. 2001. Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of (beta)-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo. *J Neurosci* 21:1327-33
- Kim JM, Kim DH, Lee Y, Park SJ, Ryu JH. 2014. Distinct roles of the hippocampus and perirhinal cortex in GABAA receptor blockade-induced enhancement of object recognition memory. *Brain Res* 1552:17-25
- Kimple RJ, De Vries L, Tronchere H, Behe CI, Morris RA, et al. 2001. RGS12 and RGS14 GoLoco motifs are G alpha(i) interaction sites with guanine nucleotide dissociation inhibitor Activity. *J Biol Chem* 276:29275-81
- Kitazawa M, Medeiros R, Laferla FM. 2012. Transgenic mouse models of Alzheimer disease: developing a better model as a tool for therapeutic interventions. *Curr Pharm Des* 18:1131-47
- Knobloch M, Farinelli M, Konietzko U, Nitsch RM, Mansuy IM. 2007. Abeta oligomer-mediated long-term potentiation impairment involves protein phosphatase 1-dependent mechanisms. *J Neurosci* 27:7648-53
- Knogler LD, Liao M, Drapeau P. 2010. Synaptic scaling and the development of a motor network. *J Neurosci* 30:8871-81

- Krum JM, Kenyon KL, Rosenstein JM. 1997. Expression of blood-brain barrier characteristics following neuronal loss and astroglial damage after administration of anti-Thy-1 immunotoxin. *Exp Neurol* 146:33-45
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5
- Larminie C, Murdock P, Walhin JP, Duckworth M, Blumer KJ, et al. 2004. Selective expression of regulators of G-protein signaling (RGS) in the human central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 122:24-34
- Lashgari R, Motamedi F, Zahedi Asl S, Shahidi S, Komaki A. 2006. Behavioral and electrophysiological studies of chronic oral administration of L-type calcium channel blocker verapamil on learning and memory in rats. *Behav Brain Res* 171:324-8
- Laube B, Kuhse J, Betz H. 1998. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18:2954-61
- Lautier D, Lagueux J, Thibodeau J, Menard L, Poirier GG. 1993. Molecular and biochemical features of poly (ADP-ribose) metabolism. *Mol Cell Biochem* 122:171-93
- Lech RK, Suchan B. 2013. The medial temporal lobe: memory and beyond. *Behav Brain Res* 254:45-9
- Lee SE, Simons SB, Heldt SA, Zhao M, Schroeder JP, et al. 2010. RGS14 is a natural suppressor of both synaptic plasticity in CA2 neurons and hippocampal-based learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16994-8
- Lee YS, Silva AJ. 2009. The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:126-40
- Leon WC, Bruno MA, Allard S, Nader K, Cuello AC. 2010. Engagement of the PFC in consolidation and recall of recent spatial memory. *Learn Mem* 17:297-305
- Levy A, Kong RM, Stillman MJ, Shukitt-Hale B, Kadar T, et al. 1991. Nimodipine improves spatial working memory and elevates hippocampal acetylcholine in young rats. *Pharmacol Biochem Behav* 39:781-6
- Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. 2009. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 62:788-801
- Li YQ, Xue YX, He YY, Li FQ, Xue LF, et al. 2011. Inhibition of PKMzeta in nucleus accumbens core abolishes long-term drug reward memory. *J Neurosci* 31:5436-46
- Lisman J, Schulman H, Cline H. 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3:175-90
- Liu P, Smith PF, Darlington CL. 2008. Glutamate receptor subunits expression in memory-associated brain structures: regional variations and effects of aging. *Synapse* 62:834-41
- Lopez-Aranda MF, Acevedo MJ, Carballo FJ, Gutierrez A, Khan ZU. 2006. Localization of the GoLoco motif carrier regulator of G-protein signalling 12 and 14 proteins in monkey and rat brain. *Eur J Neurosci* 23:2971-82
- Lopez-Aranda MF, Lopez-Tellez JF, Navarro-Lobato I, Masmudi-Martin M, Gutierrez A, Khan ZU. 2009. Role of layer 6 of V2 visual cortex in object-recognition memory. *Science* 325:87-9
- Lopez-Arrieta JM, Birks J. 2002. Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia. *Cochrane Database Syst Rev*:CD000147
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75
- Lu KT, Walker DL, Davis M. 2001. Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *J Neurosci* 21:RC162
- Lu W, Khatri L, Ziff EB. 2014. Trafficking of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) receptor subunit GluA2 from the endoplasmic reticulum is stimulated by a complex containing Ca²⁺/calmodulin-activated kinase II (CaMKII) and PICK1 protein and by release of Ca²⁺ from internal stores. *J Biol Chem* 289:19218-30
- Lu W, Shi Y, Jackson AC, Bjorgan K, During MJ, et al. 2009. Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* 62:254-68
- Lucchesi W, Mizuno K, Giese KP. 2011. Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation. *Brain Res Bull* 85:2-8
- Malenka RC, Bear MF. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21

- Malkova L, Forcelli PA, Wellman LL, Dybdal D, Dubach MF, Gale K. 2015. Blockade of glutamatergic transmission in perirhinal cortex impairs object recognition memory in macaques. *J Neurosci* 35:5043-50
- Marchetti C, Marie H. 2011. Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer's disease: what have we learned so far from transgenic models? *Rev Neurosci* 22:373-402
- Martin-Montanez E, Acevedo MJ, Lopez-Tellez JF, Duncan RS, Mateos AG, et al. 2010. Regulator of G-protein signaling 14 protein modulates Ca(2)+ influx through Cav1 channels. *Neuroreport* 21:1034-9
- Martin CB, McLean DA, O'Neil EB, Kohler S. 2013. Distinct familiarity-based response patterns for faces and buildings in perirhinal and parahippocampal cortex. *J Neurosci* 33:10915-23
- Martin SJ, Morris RG. 2002. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12:609-36
- Massey PV, Bhabra G, Cho K, Brown MW, Bashir ZI. 2001. Activation of muscarinic receptors induces protein synthesis-dependent long-lasting depression in the perirhinal cortex. *Eur J Neurosci* 14:145-52
- Massey PV, Johnson BE, Moulton PR, Auberson YP, Brown MW, et al. 2004. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 24:7821-8
- McCaffery B, Cho K, Bortolotto ZA, Aggleton JP, Brown MW, et al. 1999. Synaptic depression induced by pharmacological activation of metabotropic glutamate receptors in the perirhinal cortex in vitro. *Neuroscience* 93:977-84
- Mead AN, Stephens DN. 2003. Involvement of AMPA receptor GluR2 subunits in stimulus-reward learning: evidence from glutamate receptor *gria2* knock-out mice. *J Neurosci* 23:9500-7
- Migues PV, Hardt O, Wu DC, Gamache K, Sacktor TC, et al. 2010. PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci* 13:630-4
- Mittal V, Linder ME. 2004. The RGS14 GoLoco domain discriminates among Galphai isoforms. *J Biol Chem* 279:46772-8
- Mittal V, Linder ME. 2006. Biochemical characterization of RGS14: RGS14 activity towards G-protein alpha subunits is independent of its binding to Rap2A. *Biochem J* 394:309-15
- Moore CI, Browning MD, Rose GM. 1993. Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged Fischer 344 rats. *Hippocampus* 3:57-66
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-6
- Moyer JR, Jr., Thompson LT, Black JP, Disterhoft JF. 1992. Nimodipine increases excitability of rabbit CA1 pyramidal neurons in an age- and concentration-dependent manner. *J Neurophysiol* 68:2100-9
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, et al. 2000. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050-8
- Murray EA, Bussey TJ, Saksida LM. 2007. Visual perception and memory: a new view of medial temporal lobe function in primates and rodents. *Annu Rev Neurosci* 30:99-122
- Naie K, Manahan-Vaughan D. 2005. Pharmacological antagonism of metabotropic glutamate receptor 1 regulates long-term potentiation and spatial reference memory in the dentate gyrus of freely moving rats via N-methyl-D-aspartate and metabotropic glutamate receptor-dependent mechanisms. *Eur J Neurosci* 21:411-21
- Navarro-Lobato I. 2015. *RGS14₄₁₄-mediated prevention of an episodic memory loss: a study of molecular mechanism*. Ph.D. thesis. Universidad de Málaga, Málaga
- Nelson SB, Turrigiano GG. 2008. Strength through diversity. *Neuron* 60:477-82
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R. 2002. G protein pathways. *Science* 296:1636-9
- Nolan BC, Freeman JH, Jr. 2005. Purkinje cell loss by OX7-saporin impairs excitatory and inhibitory eyeblink conditioning. *Behav Neurosci* 119:190-201
- Norris CM, Korol DL, Foster TC. 1996. Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging. *J Neurosci* 16:5382-92

- Nyberg L, Lovden M, Riklund K, Lindenberg U, Backman L. 2012. Memory aging and brain maintenance. *Trends Cogn Sci* 16:292-305
- O'Brien RJ, Kamboj S, Ehlers MD, Rosen KR, Fischbach GD, Huganir RL. 1998. Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron* 21:1067-78
- Oster H, Eichele G, Leitges M. 2004. Differential expression of atypical PKCs in the adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 127:79-88
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, et al. 2007. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55:697-711
- Passafaro M, Nakagawa T, Sala C, Sheng M. 2003. Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature* 424:677-81
- Paxinos G, Franklin KBJ. 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8392-6
- Persson J, Pudas S, Lind J, Kauppi K, Nilsson LG, Nyberg L. 2012. Longitudinal structure-function correlates in elderly reveal MTL dysfunction with cognitive decline. *Cereb Cortex* 22:2297-304
- Petersen RC. 2000. Aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Neurol Clin* 18:789-806
- Premkumar LS, Auerbach A. 1997. Stoichiometry of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns. *J Gen Physiol* 110:485-502
- Prithviraj R, Kelly KM, Espinoza-Lewis R, Hexom T, Clark AB, Inglis FM. 2008. Differential regulation of dendrite complexity by AMPA receptor subunits GluR1 and GluR2 in motor neurons. *Dev Neurobiol* 68:247-64
- Puzzo D, Privitera L, Fa M, Staniszewski A, Hashimoto G, et al. 2011. Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol* 69:819-30
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, et al. 2008. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 28:14537-45
- Quartermain D, deSoria VG, Kwan A. 2001. Calcium channel antagonists enhance retention of passive avoidance and maze learning in mice. *Neurobiol Learn Mem* 75:77-90
- Ranganath C, Ritchey M. 2012. Two cortical systems for memory-guided behaviour. *Nat Rev Neurosci* 13:713-26
- Raz N, Lindenberg U, Rodrigue KM, Kennedy KM, Head D, et al. 2005. Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers. *Cereb Cortex* 15:1676-89
- Reiser J. 2000. Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. *Gene Ther* 7:910-3
- Resende R, Pereira C, Agostinho P, Vieira AP, Malva JO, Oliveira CR. 2007. Susceptibility of hippocampal neurons to Abeta peptide toxicity is associated with perturbation of Ca²⁺ homeostasis. *Brain Res* 1143:11-21
- Rodrigue KM, Raz N. 2004. Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults. *J Neurosci* 24:956-63
- Rosenzweig ES, Rao G, McNaughton BL, Barnes CA. 1997. Role of temporal summation in age-related long-term potentiation-induction deficits. *Hippocampus* 7:549-58
- Ross EM, Wilkie TM. 2000. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 69:795-827
- Rouleau M, Aubin RA, Poirier GG. 2004. Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J Cell Sci* 117:815-25
- Sacktor TC. 2011. How does PKMzeta maintain long-term memory? *Nat Rev Neurosci* 12:9-15
- Saganich MJ, Schroeder BE, Galvan V, Bredesen DE, Koo EH, Heinemann SF. 2006. Deficits in synaptic transmission and learning in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice require C-terminal cleavage of APP. *J Neurosci* 26:13428-36

- Sagata N, Iwaki A, Aramaki T, Takao K, Kura S, et al. 2010. Comprehensive behavioural study of GluR4 knockout mice: implication in cognitive function. *Genes Brain Behav* 9:899-909
- Salmon DP. 2012. Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease. *Curr Top Behav Neurosci* 10:187-212
- Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE. 2000. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 20:8177-87
- Schiapparelli L, Simon AM, Del Rio J, Frechilla D. 2006. Opposing effects of AMPA and 5-HT1A receptor blockade on passive avoidance and object recognition performance: correlation with AMPA receptor subunit expression in rat hippocampus. *Neuropharmacology* 50:897-907
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:517-28
- Seoane A, Massey PV, Keen H, Bashir ZI, Brown MW. 2009. L-type voltage-dependent calcium channel antagonists impair perirhinal long-term recognition memory and plasticity processes. *J Neurosci* 29:9534-44
- Serrano P, Friedman EL, Kenney J, Taubenfeld SM, Zimmerman JM, et al. 2008. PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. *PLoS Biol* 6:2698-706
- Shalin SC, Zirrgiebel U, Honsa KJ, Julien JP, Miller FD, et al. 2004. Neuronal MEK is important for normal fear conditioning in mice. *J Neurosci Res* 75:760-70
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, et al. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837-42
- Shema R, Haramati S, Ron S, Hazvi S, Chen A, et al. 2011. Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase Mzeta in the neocortex. *Science* 331:1207-10
- Shema R, Hazvi S, Sacktor TC, Dudai Y. 2009. Boundary conditions for the maintenance of memory by PKMzeta in neocortex. *Learn Mem* 16:122-8
- Shing YL, Werkle-Bergner M, Brehmer Y, Muller V, Li SC, Lindenberger U. 2010. Episodic memory across the lifespan: the contributions of associative and strategic components. *Neurosci Biobehav Rev* 34:1080-91
- Shu FJ, Ramineni S, Amyot W, Hepler JR. 2007. Selective interactions between Gi alpha1 and Gi alpha3 and the GoLoco/GPR domain of RGS14 influence its dynamic subcellular localization. *Cell Signal* 19:163-76
- Shu FJ, Ramineni S, Hepler JR. 2010. RGS14 is a multifunctional scaffold that integrates G protein and Ras/Raf MAPkinase signalling pathways. *Cell Signal* 22:366-76
- Simonyi A, Serfozo P, Shelat PB, Dopheide MM, Coulibaly AP, Schachtman TR. 2007. Differential roles of hippocampal metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in inhibitory avoidance learning. *Neurobiol Learn Mem* 88:305-11
- Snow BE, Antonio L, Suggs S, Gutstein HB, Siderovski DP. 1997. Molecular cloning and expression analysis of rat Rgs12 and Rgs14. *Biochem Biophys Res Commun* 233:770-7
- Squire LR, Stark CE, Clark RE. 2004. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 27:279-306
- Squire LR, Wixted JT, Clark RE. 2007. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci* 8:872-83
- Stellwagen D, Malenka RC. 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature* 440:1054-9
- Stern SA, Alberini CM. 2013. Mechanisms of memory enhancement. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 5:37-53
- Swanson GT, Kamboj SK, Cull-Candy SG. 1997. Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *J Neurosci* 17:58-69
- Swick D, Knight RT. 1999. Contributions of prefrontal cortex to recognition memory: electrophysiological and behavioral evidence. *Neuropsychology* 13:155-70
- Sydow A, Van der Jeugd A, Zheng F, Ahmed T, Balschun D, et al. 2011. Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant. *J Neurosci* 31:2511-25
- Taylor KI, Probst A. 2008. Anatomic localization of the transentorhinal region of the perirhinal cortex. *Neurobiol Aging* 29:1591-6

- Thompson LT, Deyo RA, Disterhoft JF. 1990. Nimodipine enhances spontaneous activity of hippocampal pyramidal neurons in aging rabbits at a dose that facilitates associative learning. *Brain Res* 535:119-30
- Tinsley CJ, Fontaine-Palmer NS, Vincent M, Endean EP, Aggleton JP, et al. 2011. Differing time dependencies of object recognition memory impairments produced by nicotinic and muscarinic cholinergic antagonism in perirhinal cortex. *Learn Mem* 18:484-92
- Tinsley CJ, Narduzzo KE, Ho JW, Barker GR, Brown MW, Warburton EC. 2009. A role for calcium-calmodulin-dependent protein kinase II in the consolidation of visual object recognition memory. *Eur J Neurosci* 30:1128-39
- Tollefson GD. 1990. Short-term effects of the calcium channel blocker nimodipine (Bay-e-9736) in the management of primary degenerative dementia. *Biol Psychiatry* 27:1133-42
- Tombaugh GC, Rowe WB, Chow AR, Michael TH, Rose GM. 2002. Theta-frequency synaptic potentiation in CA1 in vitro distinguishes cognitively impaired from unimpaired aged Fischer 344 rats. *J Neurosci* 22:9932-40
- Traissard N, Herbeaux K, Cosquer B, Jeltsch H, Ferry B, et al. 2007. Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer's disease: effects on locomotor activity and memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology* 32:851-71
- Traver S, Bidot C, Spassky N, Baltauss T, De Tand MF, et al. 2000. RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of Gα_q. *Biochem J* 350 Pt 1:19-29
- Traver S, Spingard A, Gaudriault G, De Gunzburg J. 2004. The RGS (regulator of G-protein signalling) and GoLoco domains of RGS14 co-operate to regulate Gi-mediated signalling. *Biochem J* 379:627-32
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, et al. 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62:405-96
- Trinchese F, Liu S, Battaglia F, Walter S, Mathews PM, Arancio O. 2004. Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann Neurol* 55:801-14
- Turrigiano GG. 2008. The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135:422-35
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB. 1998. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391:892-6
- Turrigiano GG, Nelson SB. 2004. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5:97-107
- van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP. 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 10:272-82
- Vaseghi G, Hajhashemi V, Rabbani M. 2014. The effect of nimodipine on memory loss following naloxone-induced morphine withdrawal in object recognition. *Res Pharm Sci* 9:445-51
- Vaseghi G, Rabbani M, Hajhashemi V. 2012. The effect of nimodipine on memory impairment during spontaneous morphine withdrawal in mice: Corticosterone interaction. *Eur J Pharmacol* 695:83-7
- Volk LJ, Bachman JL, Johnson R, Yu Y, Haganir RL. 2013. PKM-zeta is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. *Nature* 493:420-3
- Wang SH, Liao XM, Liu D, Hu J, Yin YY, et al. 2012. NGF promotes long-term memory formation by activating poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Neuropharmacology* 63:1085-92
- Warburton EC, Brown MW. 2010. Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia* 48:2262-72
- Warburton EC, Koder T, Cho K, Massey PV, Duguid G, et al. 2003. Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron* 38:987-96
- Watson HC, Lee AC. 2013. The perirhinal cortex and recognition memory interference. *J Neurosci* 33:4192-200
- Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva AJ, Soderling TR. 2008. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* 59:914-31
- Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J, II, Niedzielski AS. 1996. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16:1982-9

VII. References

- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313:1093-7
- Willard FS, Willard MD, Kimple AJ, Soundararajan M, Oestreich EA, et al. 2009. Regulator of G-protein signaling 14 (RGS14) is a selective H-Ras effector. *PLoS One* 4:e4884
- Williams-Gray CH, Foltynie T, Lewis SJ, Barker RA. 2006. Cognitive deficits and psychosis in Parkinson's disease: a review of pathophysiology and therapeutic options. *CNS Drugs* 20:477-505
- Winters BD, Bartko SJ, Saksida LM, Bussey TJ. 2007. Scopolamine infused into perirhinal cortex improves object recognition memory by blocking the acquisition of interfering object information. *Learn Mem* 14:590-6
- Winters BD, Bussey TJ. 2005. Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci* 25:4243-51
- Woodard GE, Jardin I, Berna-Erro A, Salido GM, Rosado JA. 2015. Regulators of g-protein-signaling proteins: negative modulators of g-protein-coupled receptor signaling. *Int Rev Cell Mol Biol* 317:97-183
- Woodside BL, Borroni AM, Hammonds MD, Teyler TJ. 2004. NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels mediate different aspects of acquisition and retention of a spatial memory task. *Neurobiol Learn Mem* 81:105-14
- Wu X, Wakefield JK, Liu H, Xiao H, Kralovics R, et al. 2000. Development of a novel trans-lentiviral vector that affords predictable safety. *Mol Ther* 2:47-55
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134
- Yonelinas AP. 2001. Components of episodic memory: the contribution of recollection and familiarity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:1363-74
- Yonelinas AP, Aly M, Wang WC, Koen JD. 2010. Recollection and familiarity: examining controversial assumptions and new directions. *Hippocampus* 20:1178-94
- Yoon YJ, White SL, Ni X, Gokin AP, Martin-Caraballo M. 2012. Downregulation of GluA2 AMPA receptor subunits reduces the dendritic arborization of developing spinal motoneurons. *PLoS One* 7:e49879
- Yu DF, Wu PF, Fu H, Cheng J, Yang YJ, et al. 2011. Aging-related alterations in the expression and distribution of GluR2 and PICK1 in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 497:42-5
- Zhu JJ, Esteban JA, Hayashi Y, Malinow R. 2000. Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* 3:1098-106
- Ziakopoulos Z, Tillett CW, Brown MW, Bashir ZI. 1999. Input-and layer-dependent synaptic plasticity in the rat perirhinal cortex in vitro. *Neuroscience* 92:459-72

VIII. Appendices

1 Appendix 1. MOLECULAR BIOLOGY

1.a) Electrophoresis in agarose gel

1.a.1) Tris-Boric acid-EDTA buffer (TBE) 5X, 1 L

REAGENT	AMOUNT
Tris (Sigma-Aldrich,T1503)	54 g
Boric acid (Sigma-Aldrich,b6768)	27.5 g
Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA (Sigma-Aldrich,E5134)	3.72 g
Milli-Q water	Up to 1 L

1.a.2) 1 % Agarose gel

REAGENT	AMOUNT	
	Small gel (8 wells)	Big gel (10 wells)
Agarose (E0301, EuRx)	0.4 g	1 g
TBE 1X buffer * ¹	40 ml	100 ml
Ethidium Bromide (0,1 mg/ml) * ²	68 µl	170 µl

*¹ Prepared mixing 200 ml of TBE 5X (appendix 1.a.1).

*² Prepared using 10 mg/ml Ethidium Bromide stock solution (Invitrogen, 15585-011).

1.b) Gene amplification in bacteria

1.b.1) Bacterial growth media: 100 µg/ml ampicillin LB and LB-Agar

REAGENT	AMOUNT
LB Broth Base (Invitrogen, 12780-052)	20 g
Sodium chloride (NaCl) (Sigma-Aldrich, S3014)	5 g
Milli-Q water	Up to 1 L

After dissolving LB and NaCl 1 L in Milli-Q water, the resulting volume was distributed into two 1 L glass bottles (500 ml each one). 7.5 g of LB-Agar (Invitrogen, 22700-025) were added to one of the bottles and LB-Agar medium was made. The medium without LB-Agar was called LB liquid medium. Both media were sterilized by moist heat at 121 °C / 15 min in an autoclave (sterilclav-75, Raypa) and were chilled to 50 °C to avoid solidifying. Then, at the laminar flow cabinet, 500 µl of 100 mg/ml ampicillin solution (Sigma-Aldrich, A9393) were added to each bottle of medium (ampicillin final concentration: 100 µg/ml). The 100 µg/ml

ampicillin LB medium was stored at 4 °C, whereas the 100 µg/ml ampicillin LB-Agar was dispensed in 90 mm Petri plates (20-25 ml per plate) and once the agar had solidified, plates were stored at 4 °C.

1.b.2) Heat shock transformation

With the goal to amplify, samples after ligation containing RGS14₄₁₄ recombinant DNA were transformed into *One Shot® Omni Max™ 2 T1® Chemically Competent E.coli* (Life Technologies, Cat. No. C8540-03) by heat shock according to the manufacturer's protocol.

4 µl of the ligation product (10 pg to 100 ng), were added to a vial containing 50 µl of competent cells and gently mixed. The mixture was incubated on ice for 30 min and cells were heat-shocked for 30 s at 42 °C without shaking at the thermostatic bath SW22 (Julabo) to facilitate the entrance of DNA into *E. coli*. The vial was immediately returned to ice for 2 min and 250 µl of pre-warmed *SOC medium* was added to the transformed bacteria. This vial was incubated for 90 min at 37 °C with shaking at 225 rpm in an orbital shaker incubator (Optic Ivymen System). Aliquots of transformed bacteria (20, 50 and 200 µl) were spread on LB-Agar plates prepared with 100 µg/ml ampicillin (Appendix 1.b.1) and were incubated for 18 h at 37 °C at an incubator (Incudigit, J.P Selecta). The ampicillin resistant colonies were then processed for miniprep to identify colonies expressing correct size of gene insert.

1.c) DNA purification by minicolumn systems

1.c.1) Purification of DNA PCR product

The PCR product purification was carried out by MiniElute PCR purification kit (Quiagen, 28004) according to the manufacturer's protocol:

Sample preparation: 5 volumes of Buffer PBI were added to one volume of PCR product reaction and the resulting volume was mixed by pipetting. Then, 100 µl of isopropanol were added for each 50 µl of PCR product reaction.

DNA binding: the sample was applied to the MiniElute column and passed through it by centrifugation at 13000 x g for 1 min and the flowthrough was discarded.

Washing: the DNA was washed adding 750 µl of wash buffer PE and centrifuging at 13000 x g for 1 min. An additional centrifugation for 1 min was done to remove any residual ethanol from PE buffer. Then, each column was placed in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.

Elution: to elute the DNA from the column, 10 µl of Buffer EB was carefully added to the center of the membrane and the column was stood for 2 min at room temperature before centrifuging at 13000 x g for 1 min. Eluted DNA was stored at -20 °C.

1.c.2) DNA purification from agarose gel

The DNA purification from agarose gel was performed using the *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit* (Promega, A9281) following the manufacturer's protocol:

DNA binding: the gel was dissolved by adding 1 µl of Membrane Binding Buffer per 1 mg of gel slice and incubated at 60 °C. Vortex and spin were done every 10 min until the band was completely dissolved. The dissolved gel mixture was transferred to the *Wizard SV Minicolumn* assembly (Promega, A129A) and left for 5

min at room temperature. Column was centrifuged at 16000 x g for 1 min (Mikro-22 microcentrifuge from Hettich Zentrifugen) and the flowthrough was discarded.

Washing: Column-bound DNA was washed with 700 µl of Wash Buffer containing 95 % (v/v) ethanol by centrifugation at 16000 x g for 1 min. This step was repeated with 500 µl of the same buffer. Residual wash buffer from column was removed by centrifugation and further dried at 37 °C for 90 min to remove any residual ethanol.

DNA Elution. DNA was eluted by adding 50 µl of Nuclease-Free Water to the center of column membrane. Following, column was incubating at room temperature for 5 min and then centrifuging at 16,000 x g for 5 min. Eluted DNA was stored at -20 °C.

1.c.3) Miniprep reaction

To extract and purify DNA from bacteria culture the *StrataPrep plasmid miniprep kit* (Agilent technologies, 400761) was used following the manufacturer's protocol with some modifications:

Lysing bacteria and DNA extraction: Aliquots of 1 ml of bacterial culture were pellet by centrifugation at 13000 x g for 1 min in a Mikro-22 centrifuge (Hettich Zentrifugen). To destroy bacterial membranes and release DNA, pellets were resuspended in 100 µl of solution 1, vortexing vigorously and pipetting up and down to disperse cells completely. Then 100 µl of solution 2 were added and mixed by inversion several times. Following, 250 µl of solution 3 were added and mixed again by inversion. Finally, the cellular debris were settled down by centrifugation at 13000 x g for 5 min, and the supernatants containing the DNA were carefully collected.

Binding: Supernatants were transferred to a microspin cup, incubated for 1 min at room temperature and then centrifuged at 13000 x g for 30 s. The flowthroughs were recovered and passed through the column again. An additional re-centrifugation was done. To avoid DNA degradation, endonucleases were removed by adding 650 µl of 1 x nuclease-removal buffer and centrifuging at 13000 x g for 1 min.

Washing: The DNA bound was washed by adding 700 µl of 2X wash buffer diluted in absolute ethanol and then was centrifuged as above. Re-centrifugation for 30 s was done to eliminate any residual ethanol-wash buffer. The column was transferred to a new clear 1.5 ml tube and left overnight at room temperature to evaporate any residual ethanol.

DNA elution. Finally, to elute DNA, 50 µl of Nucleases Free Water were added directly onto the fiber matrix at the bottom of the microspin cup. The sample was incubated for 5 min at room temperature and then centrifuged at 19000 x g for 1 min. DNA obtained was stored at 4 °C.

1.c.4) Maxiprep reaction

RGS14₄₁₄ recombinant DNA purification was carried out using the *Wizard® Plus Maxiprep DNA Purification System kit* (Promega, A7270) following the manufacturer's protocol:

Lysing bacteria and DNA extraction: Aliquots of 35 ml of bacterial culture were centrifuged at 5000 x g for 10 min at the Rotine 420 centrifuge (Hettich Zentrifugen). To destroy bacterial membranes and release DNA, each pellet was resuspended in 10 ml of solution P1, pipetting up and down and vortexing to disperse cells completely. Then 10 ml of lysis solution P2 were added and mixed by inversion several times. The mixture was incubated for 5 min at room temperature before adding 10 ml of neutralization solution P3. The solution was mixed again by gently inversion until it lost the blue color and then incubated on ice for 15 min. In order to remove the cellular debris, they were pellet by centrifugation at 20,000 x g for 30 min at 4 °C at Sorvall RC5C

centrifuge, using the rotor SS34. The supernatant containing the DNA (≈ 25 ml) was collected and filtered using a Whatman filter.

Column equilibration and DNA binding: During the DNA filtration, the affinity column was equilibrated by applying 10 ml of *equilibration buffer*, *QBF*, allowing the column to empty by gravity flow. Then, filtered DNA solution was passed through the equilibrated column by gravity.

Washing: The DNA bound to the column was washed twice applying 30 ml of *wash buffer*, *QC* by gravity.

Elution. The DNA was eluted from the column with 15 ml of *elution buffer*, *QF* and collected in a 50 ml centrifuge tube (Nalgene, 3115-0050). 10.5 ml of isopropanol (Fluka, 59304) were added and the sample was mixed, incubated for 5 min at room temperature and then centrifuged at 20,000 x g for 30 min at 4 °C at Sorval RC5C centrifuge with the rotor SS34. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 5 ml of 70 % (v/v) ethanol by pipetting up and down. Another centrifugation at 15,000 x g for 10 min at Rotina 420 centrifuge (Hettich Zentrifugen) was done and the supernatant was discarded. The tube was incubated for 45 min at 37 °C to eliminate any residual ethanol. The pellet was resuspended in 1 ml Nuclease Free Water and the DNA solution was stored at 4 °C. The purified DNA concentration was estimated spectrophotometrically at 260 nm in Nanodrop1000, v3.7 (Thermo Scientific).

1.d) qRT-PCR

1.d.1) Total RNA extraction

The total RNA from V2 area was isolated using the *RNeasy Tissue Mini kit* (Quiagen, 74124) according to the manufacturer's protocol:

Lysis and homogenated: The stabilized tissue was removed from the RNA stabilization reagent RNeasy Lysis Buffer (Quiagen, 1018087) with a forceps and frozen into liquid nitrogen. Immediately the sample was grinded thoroughly with a mortar and pestle. The tissue powder was collected in 1 ml of *QIAzol Lysis Reagent* and incubated for 5 min at room temperature. 200 μ l of chloroform were added and gently mixed for 15 s. The mixture was incubated for 3 min at room temperature.

Separation of liquid phases: A centrifugation at 12000 x g for 15 min at 4 °C in a centrifuge (Beckman CS-15R, rotor F2402H) was carried out, and the aqueous phase was collected in a new 1.5 ml tube. The aqueous phase was mixed with the same volume of 70 % (v/v) ethanol by vigorous vortex.

RNA binding: The sample was transferred to a *RNeasy* column and incubated for 2 min at room temperature. A centrifugation at ≥ 8000 x g for 15 s at room temperature (15-25 °C) was done, and the throughflow was discarded.

Washing: The RNA bound to the membrane was washed adding 700 μ l of *Buffer RW1* to the column and centrifuging at ≥ 8000 x g for 15 s at room temperature (15-25 °C). Then 500 μ l of *Buffer RPE* was added and centrifuged again. Finally others 500 μ l were passed through the column by a centrifugation for 2 min. To eliminate any residual buffer, the column was centrifuged once more at maximum speed for 1 min.

Elution: The *RNeasy* column was placed onto a new clear 1.5 ml tube and 30 μ l of *Nuclease-Free water* were added directly on the membrane. An incubation of 2 min at room temperature was done before collecting the RNA by centrifugation at ≥ 8000 x g for 1 min at room temperature. RNA samples were stored at -80 °C.

1.d.2) Determination of optimal primer concentration

Optimal primer concentration for qRT-PCR experiments is given by:

- i) The lowest Ct (threshold cycle) and maximum ΔRn (change in signal during amplification compared to baseline). Ct and ΔRn values are obtained from the 7500 V2.0.6 software; being Ct the cycle number at which the fluorescent signal of the reaction crosses the threshold, and ΔRn the increment of the fluorescent signal which is specific of the accumulated PCR product.
- ii) The presence of a unique specific PCR product which can be confirmed by the melting curve.
- iii) The presence of a unique band with the correct size of the amplicon in a 1 % agarose gel electrophoresis.

2 Appendix 2. CELL CULTURE

2.a) Gelatin-coated culture flasks

0.3 % (w/v) gelatin solution was prepared dissolving 1.5 g of gelatin (Sigma Aldrich, G-9391) in 500 ml of Milli-Q water. The solution was sterilized by moist heat at 121°C / 20 min in an autoclave (sterilclav-75, Raypa) and then stored at 4 °C. 5 ml of this mixture were added to each flask covering the entire surface area and then, the flasks were placed in a 37 °C incubator for 15-20 min. The excess of solution was removed and flasks were dried at room temperature overnight before seeding.

2.b) Cell freezing and thawing

2.b.1) Freezing a cell stock

In order to have a renewable source of cells, aliquots of cellular suspension were prepared and frozen in liquid nitrogen (-196 °C). A 90 %-confluence subculture was performed. Once the cellular density and viability were estimated (Appendix 2.c), the total number of cells was determined and then cells were deposited by centrifugation at 150 x g for 5 min discarding the supernatant carefully. The pellet was resuspended in the required freezing medium (90 % complete medium without antibiotic and 10 % of DMSO (Sigma Aldrich, D8418) to have the recommended viable cell density of 3×10^6 cells/ml. Aliquots of the cell suspension were dispensed into cryovials and then frozen and stored in liquid nitrogen.

2.b.2) Thawing frozen cells

The cryovial of each cell line (HT1080 or 293T) was thawed rapidly in a 37 °C water bath and then the outside of the cryovial was dry off and wiped with 70 % (v/v) ethanol solution. The content was transferred to a 15 ml conical centrifuge tube containing 10 ml of pre-warmed complete medium and mixed gently at the laminar flow cabinet. Cells were settled down by centrifugation at 150-200 x g for 5 min, the supernatant was carefully aspirated and cells were resuspended in 2 ml of complete medium without antibiotic. This step is necessary to eliminate any residual cryopreservative DMSO (Sigma Aldrich, D8418). The cellular suspension was added to a 75 cm² flask (Nunc, 156499) containing 10 ml of pre-warmed complete medium without antibiotic and gently rocked to distribute the cells evenly over the growth surface.

2.c) Cell subcultures

The cell subcultures were carried out every 3-4 days after reaching a confluence of 80-90 % according to the following protocol:

Trypsinization: The flask was washed with pre-warmed PBS pH 7.4 (Gibco, 10010) for 1 min after removing the medium. The PBS was aspirated and cells were detached adding trypsin-EDTA (Gibco, 25200-072), 3 ml to 75 cm² flasks (Nunc, 156499) or 5 ml to 175 cm² flasks (Nunc, 159910). When the majority of the cells were detached, an equal volume of pre-warmed complete media were added into the flask to neutralize the trypsin-EDTA and the suspension of cells was collected in a 50 ml conical centrifuge tube. Cell suspension was centrifuged at 1500 rpm for 5 min at the Labofuge 400 (Heraeus) and the supernatant was carefully discarded. The cell pellet was resuspended in 10ml pre-warmed complete medium by pipetting up and down gently.

Cell Counting: the cellular density and viability were estimated by 0,4 % trypan blue (Sigma-Aldrich, T8154) method in a Neubauer chamber (Bright Line, Rbichert).

Cell seeding: New culture flasks were seeded at appropriate cell densities according to the cell line's manuals.

2.d) Transfection

The transfection was carried out using *Lenti-XTM Packaging System* (Clontech, 631247) according to the manufacturer's protocol. 4.5×10^6 of 293T cells per plate were seeded in twelve 100 mm Petri plates (Corning, 734-1815) containing 10 ml of complete medium but without antibiotic. After 24 h, the transfection solution (tube 1 + tube 2) was prepared as shown in the table below and added to each plate.

Tube 1	Tube 2
557 μ l Xfect Reaction Buffer (Clontech, 631317)	592.5 μ l Xfect Reaction Buffer (Clontech, 631317)
36 μ l Lenti-X HTX Packaging Mix (Clontech, 631260)	7.5 μ l Xfect Polymer (Clontech, 631317)
7 μ l Lenti-X Vector DNA (1 μ g/ μ l)	Total volume 600
Total volume 600	

The polymer solution (tube 2) was mixed with the DNA solution (tube 1) and incubated for 10 min at room temperature to allow complex formation. Mixed solution of 1200 μ l was added dropwise to cell culture plate and then, was gently rocked before incubating at 37 °C in 5% CO₂. After 24 h, transfection medium was replaced with 10 ml fresh complete cell culture medium and cell culture plates were incubated at 37 °C for an additional 48 h. During this period, transfected cells produce and release non-replicant lentivirus to medium. Therefore, lentiviral supernatants were harvested and pooled. Cellular debris was removed by centrifugation at 500 x g for 15 min at 4 °C in CS15R Beckman centrifuge, followed by filtration of supernatants through 0.45 μ m polysulfonic filter (Sarstedt, 831826). The lentiviral supernatants were maintained on ice during all the procedure.

2.e) Crystal violet staining

Survived cell colonies were stained in 1 % (w/v) crystal violet (Sigma Aldrich, C3886), 10 % (v/v) ethanol (JT Baker, 8025) solution. Cells were rinsed twice for 1 min in 1 ml of PBS pH 7.4 (Gibco, 10010) to eliminate cellular debris, and then incubated in the stain solution for 10 min at room temperature. To remove staining solution, 3 washes of 1 min in PBS were done.

3 Appendix 3. ORM TEST

3.a) Objects used during ORM test performed in rats



3.b) Objects used during ORM test performed in mice



4 Appendix 4. HISTOLOGY

4.a) Buffers and solutions

4.a.1) 0.4 M Phosphate Buffer (PB) pH 7.4 (1 L)

REAGENT	AMOUNT
Milli-Q water	Up to 1 L
Sodium phosphate dibasic dihydrate $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fluka, 71645)	53.4 g
Sodium di-hydrogen phosphate 1-hydrate $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Panreac, 131965)	13.8 g

The pH was adjusted to 7.4 and the buffer was stored at room temperature.

4.a.2) 0.1 M Phosphate buffered Saline (PBS) pH 7.4 (1 L)

REAGENT	AMOUNT
Milli-Q water	Up to 1 L
Sodium chloride NaCl (Panreac, 131659)	9 g
PB 0.4 M buffer, pH 7.4 (appendix 4.a.1)	250 ml

The pH was adjusted up to 7.4 and the buffer was stored at room temperature.

4.a.3) PLP fixative solution (4 % paraformaldehyde, 75 mM L-lysine and 10 mM (meta) periodate) in 0.1 M PB, pH 7.4 (1 L)

REAGENT	AMOUNT
Milli-Q water	750 ml
Paraformaldehyde (CH ₂ O) _n (Merck, 1.04005)	40 g
L-Lysine monohydrochloride C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ HCl (Sigma-Aldrich, 62929)	13.7 g
Sodium (meta)periodate INaO ₄ (Sigma, 30323)	2.14 g
PB 0.4 M, pH 7.4 (appendix 4.a.1)	250 ml

Paraformaldehyde was dissolved in 500 ml of Milli-Q water at 60 °C adding some drops of 8 N NaOH solution to facilitate paraformaldehyde dissolution. The solution was filtered using filter paper, and Milli-Q water was added up to 750 ml. In addition, the lysine and the sodium (meta) periodate were dissolved in 200 ml of 0.4 M PB buffer pH 7.4, and then PB was added up to 250 ml. Finally, both solutions were mixed.

4.a.4) 30 % (w/v) sucrose, 0.02 % (w/v) sodium azide in 0.1 M PBS buffer (100 ml)

To prepare this solution, 30 g of sucrose (Panreac, 131621) was dissolved in 0.1 M PBS buffer, pH 7.4 (Appendix 4.a.2) up to 100 ml. 200 µl of this solution was removed and 200 µl of 10 % sodium azide solution (Sigma-Aldrich, S2002) were added and the resulting solution was stored at 4 °C.

4.a.5) Mounting medium for Fluorescent immunohistochemistry (DABCO medium)

To prepare this mounting medium, a PBS-glycerol mix was prepared previously with glycerol (141339, Panreac) and 0.1 M PBS buffer pH 7.4 (appendix 4.a.2) at a proportion of 1:1. Then, DABCO (Sigma-Aldrich, D-2522) was added to 3 % (w/v) and the resulting solution was stored at 4 °C in darkness.

4.b) Gelatin-coated slides

-Preparation of the gelatin solution

REAGENT	AMOUNT
Milli-Q water	600 ml
Gelatin (Panreac, 142060)	3 g
Chromium(III) potassium sulfate (Panreac, 131284)	0.3 g

To prepare this solution, the gelatin was dissolved in 60 °C pre-warmed Milli-Q water and then the chromium (III) potassium sulfate was added.

- Preparation of gelatin-coated slides

Before the treatment with gelatin, the slides were degreased in a mixture of absolute ethanol: ether (1:1) for at least 24 h. The degreasing solution was removed and the slides were dried for 2 min at room temperature. The slides were immersed then in the gelatin solution for 1 min and this step was repeated five times for a few seconds. Finally the slides were dried for 48 h at 37 °C (they can be used up to two months after treatment).

4.c) Fixation by transcardial perfusion and brain extraction

Anesthesia and surgery: Animals were deeply anesthetized by an intraperitoneal injection of 120 mg/Kg of sodium pentobarbital (Eutanax 200 mg/ml, Fatro) before proceeding with the transcardial perfusion. In order to access the heart, a 5-6 cm lateral incision through the integument and abdominal wall just beneath the rib cage was made. Then the diaphragm was carefully incised along the entire length of the rib cage to expose the pleural cavity. Cutting through the lateral part of the rib cage on both sides, heart was exposed.

Washing: A 21 gauge perfusion needle connected to a peristaltic pump (Cole parmer) was introduced into left ventricle, and then an incision was made to the animal's right atrium. Thus, whole blood was removed by injecting 120 ml of 0.1 M PBS buffer (appendix 4.a.2) at a steady flow rate of 8 ml/min.

Fixation: Once blood vessels were washed, 350 ml of PLP fixative solution (appendix 4.a.3) were passed through the circulatory system in order to obtain the best possible preservation of the brain.

Brain dissection: Head was guillotined and brain was carefully extracted cutting the integument, the skull and muscles.

Post-fixation: The brain was kept in the fixative solution for 24 h at 4 °C.

4.d) Cryoprotection and freezing

Post-fixed brains were washed with 0.1 M PBS buffer for 10 min by exchanging the media 3 times and swirling each time to remove any residual PLP. They were immersed in 30 % (w/v) sucrose, 0.02 % (w/v) sodium azide in 0.1 M PBS buffer (appendix 4.a.4) for 7 days at 4 °C. Finally brains were frozen using dry ice and stored at -80 °C.

4.e) Brain sectioning

30 μm -thick brain tissue sections obtained from the areas of interest (area V2, perirhinal or frontal cortices) were cut using a cryostat (Leica CM-1325) and immersed in 0.02 % (w/v) sodium azide in 0.1 M PBS buffer. These sections were stored at 4 °C during several months, renewing the buffer regularly.

4.f) Fluorescent immunohistochemistry (IHC) for RGS14 protein

Before proceeding with the IHC, selected sections were washed 3 times for 10 min at room temperature in 0.1 M PBS buffer (appendix 4.a.2) with gentle agitation at room temperature. The avidin/biotin blocking kit (Vector Laboratories, SP-2001) was then used incubating the sections in each solution for 30 min at room temperature with gentle agitation. Sections were then washed 3 times with PBS as seen before and incubated overnight at 4 °C with gentle agitation in the primary RGS14-polyclonal antibody (Novus biological, NBP1-31174; dilution 1:500) produced in rabbit and diluted in 0.3 % (v/v) triton X-100 (Sigma-Aldrich, 9002-93-1), 0.1 % (w/v) sodium azide in PBS buffer. After removing the excess of primary antibody with PBS, sections were incubated for 2.5 h at room temperature in darkness in the Alexa fluor® 488-conjugated secondary antibody goat anti-rabbit IgG (Life technologies, A11008; dilution 1:1000) diluted in 0.3 % (v/v) triton X-100, 0.1 % (w/v) sodium azide, 0.1 M PBS buffer. The excess of the secondary antibody was removed with PBS (3 washes).

Mounting brain sections: Finally, slices were mounted on gelatin-coated slides (appendix 4.b) and kept overnight at room temperature to dry. Then, 1-2 drops of DABCO (appendix 4.a.5) were applied on sections and covered with the coverslip. Samples were observed under a Leica confocal microscope (Leica DM IRE2).

5 Appendix 5. PROTEOMICS

5.a) Buffers and solutions

5.a.1) 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 (50 ml)

This buffer was prepared by dissolving 0.06 g of Tris (Sigma-Aldrich, T1503) in Milli-Q water up to 50 ml. To adjust the pH at 7.4, some drops of HCl solution (T-Bakes, 6081) were added.

5.a.2) 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8 (50 ml)

This buffer was prepared by dissolving 3.02 g of Tris (Sigma-Aldrich, T1503) in Milli-Q water up to 50 ml and the pH was adjusted at 6.8.

5.a.3) Loading buffer 1X (8 ml)

Tris-HCl 60 mM pH 6.8, 2 % SDS, 10 % glicerol, 5 % 2 β -mercaptoetanol and 0.002 % blue bromophenol:

REAGENT	AMOUNT
Milli-Q water	3.88 ml
2- β mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, M7154)	0.4 ml
Glycerol, 99 % (Sigma-Aldrich, G6279)	0.8 ml
Sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 % (Sigma-Aldrich, L3771)	1.6 ml
Tris-HCL 0.5 M, pH 6.8 (appendix 5.a.2)	1 ml

5.a.4) Tris-Glycine-SDS (TGS) buffer 5X (1 L)

12.5 mM Tris, 96 mM glycine, 0.5 % SDS

REAGENT	AMOUNT
Milli-Q water	Up to 1 L
Glycine (Sigma-Aldrich, G7126)	72 g
Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma-Aldrich, L3771)	5 g
Tris (Sigma-Aldrich, T1503)	15 g

5.a.5) Phosphate Buffered Saline (PBS buffer) 10X (1 L)

REAGENT	AMOUNT
Milli-Q water	Up to 1 L
Sodium chloride (NaCl) (Sigma-Aldrich, S3014)	72.2 g
Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) (Merck-Millipore, 104873)	4.3 g
Sodium phosphate dibasic dihydrate (Na₂HP0₄ 2H₂O) (Fluka, 71645)	19 g

5.a.6) 0.1 % Tween PBS buffer 1X (TPBS) (1 L)

REAGENT	AMOUNT
Milli-Q water	900 ml
PBS buffer (10X) (appendix 5.a.5)	100 ml
Tween (Sigma-Aldrich, 9005-64)	1 ml

5.b) Lowry Method for protein determination

The protein concentration of samples were estimated by the colorimetric Lowry method (Lowry et al 1951) according to the protocol detailed below:

→*Reagents and solutions*

500 µg/ml Bovine serum albumin stock solution, (10 ml): The 500 µg/ml BSA stock solution was prepared by dissolving 5 mg of BSA (Sigma-Aldrich, A3059) in 10 ml of Milli-Q water. The solution was aliquoted in small volume of 500 µl and stored at -80 °C.

2 % Sodium carbonate solution, (50 ml): 1 g of sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3 , Panreac, 131648.1210) was dissolved in 50 ml of Milli-Q water and solution was stored at 4 °C.

1 % (w/v) copper sulfate solution (50 ml): 0.5 g of Cooper (II) sulfate anhydrous (Panreac, 122726.1209) were dissolved in 50 ml of Milli-Q and the solution was stored at 4 °C.

2 % (v/v) Na_2 tartrate solution (50 ml): 1 g of sodium tartrate anhydrous ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, Panreac, 121720.1210) was dissolved in 50 ml of Milli-Q water and the solution was stored at 4 °C

1.2 N Sodium hydroxide solution (50 ml): 2.4 g of NaOH (Panreac, 1316877787.1211) were dissolved in 50 ml of Milli-Q water and the solution was stored at 4 °C.

Alkaline copper reagent (ACR): ACR was prepared by mixing in a proportion of 100:1:1 the 2 % (w/v) Na_2CO_3 , 2 % (w/v) $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ and 1 % (w/v) CuSO_4 respectively.

2 N Folin-Ciocolteus's phenol reagent (Sigma-Aldrich, F9252)

→*Procedure*

A BSA standard curve (from 0 to 267 µg/ml) was prepared using a 500 µg/ml BSA stock solution. Three replicates were used for each concentration.

Tube	Volume of 500 µg/ml BSA (µl)	Volume of Milli-Q water (µl)	[BSA] (µg/ml)
T1	0	75	0
T2	5	75	33
T3	10	65	67
T4	20	55	133
T5	30	45	200
T6	40	35	267

Two replicates of 1/5 and 1/10 dilutions of each sample were prepared, and 75 µl of them were placed in a 1.5 ml tube. In addition, 1/5 and 1/10 dilutions of Tris-HCl 0.01 M pH 7.4 (Appendix 5.a.1) in Milli-Q water were prepared as blanks. 75 µl of NaOH 1.2 N were added to each tube and mixed by vortex.

According to the number of tubes, the adequate volume of ACR was prepared at the moment of use, 750 µl of ACR were added to each tube and mixed by vortex. Then the mixture was incubated for 15 min. 75 µl of Folin-Ciocolteus's phenol 2 N reagent:Milli-Q water in a proportion 1:1 were added to each sample and mixed by vortex. Finally, the mixture was incubated for 45 min at room temperature and the absorbance was read spectrophotometrically (S30, Boeco) at 750 nm.

6 Appendix 6. ELECTROPHYSIOLOGY

a) Modified Artificial Cerebrospinal Fluid (mACSF) , for 1 L

REAGENT	CONCENTRATION (mM)	AMOUNT (g)
Sucrose (Sigma-Aldrich, S0389)	189	64.69
Glucose (Fluka, G0350500)	10	1.80
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃) (Sigma-Aldrich, S5761)	26	2.18
Potassium chloride (KCl) (Sigma-Aldrich, P9541)	3	0.22
Magnesium sulfate (MgSO₄) (Sigma-Aldrich, M2643)	5	0.60
Calcium chloride (CaCl₂) (Sigma-Aldrich, C5670)	0.1	0.011
Sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄) (Sigma-Aldrich, S3139)	1.25	0.15

b) Artificial Cerebrospinal Fluid (ACSF) , for 1 L

REAGENT	CONCENTRATION (mM)	AMOUNT (g)
Sodium chloride (NaCl) (Sigma-Aldrich, S3014)	124	7.25
Potassium chloride (KCl) (Sigma-Aldrich, P9541)	3	0.22
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃) (Sigma-Aldrich, S5761)	26	2.18
Sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄) (Sigma-Aldrich, S3139)	1.4	0.17
Magnesium sulfate (MgSO₄) (Sigma-Aldrich, M2643)	1	0.12
Glucose (Fluka, G0350500)	10	1.8
Calcium chloride (CaCl₂) (Sigma-Aldrich, C5670)	2	0.22

Versión en español

Abreviaturas

ACSF: líquido cefalorraquídeo artificial.

AD: enfermedad de Alzheimer.

AMPA: receptor ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico.

ANOVA: análisis de la varianza.

AP: anteroposterior.

BSA: albúmina de suero bovino.

CamKII: proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} / calmodulina.

CCh: carbacol.

cDNA: DNA complementario.

CFU: unidades formadoras de colonias.

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona.

CREB: proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP.

Ct: ciclo umbral.

DABCO: 1,4-diaza-biciclo[2,2,2] octano.

DI: índice de discriminación.

DL-AP5: ácido DL-2-amino-5-fosfo-pentanoico.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DV: dorsoventral.

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares.

fEPSP: potencial post-sináptico de excitación de campo.

Fr: corteza frontal.

GAP: proteínas activadoras de GTPasas.

GDP: guanosín difosfato.

GluR1-4: receptores inotrópicos de glutamato (AMPA).

GPCR: receptor acoplado a proteínas G.

GPR (dominio): dominio regulador de las proteínas G.

GTP: guanosín trifosfato.

HFS: estimulación de alta frecuencia.

JNK: quinasa c-Jun N-terminal.

KN62: ester del ácido 4-[(2S)-2-[(5-isoquinolinilsulfonil)metilamino]-3-oxo-3-(4-fenil-1-piperazinil)propil]fenilisoquinolinsulfónico.

LFS: estimulación de baja frecuencia.

LTD: depresión a largo plazo.

LTP: potenciación a largo plazo.

LY367385: ácido (S)-(+)- α -amino-4-carboxi-2-metilbencenoacético.

mAChR: receptor colinérgico muscarínico.

mACSF: líquido cefalorraquídeo artificial modificado.

MAPKK (MKK): proteína quinasa de quinasa activada por mitógeno.

mGluR: receptor metabotrópico de glutamato.

mRNA: RNA mensajero.

MTL: lóbulo temporal medial.

NMDAR: receptor de N-metil-D-aspartato.

OD: densidad óptica.

ORM: memoria de reconocimiento de objetos.

PARP-1: poli[ADP]-ribosa polimerasa 1.

PBS: tampón fosfato salino.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PKA: proteína quinasa dependiente de cAMP.

PKC: proteína quinasa dependiente de calcio.

PKM ζ : proteína quinasa M ζ .

PLP: Periodato-Lisina-Paraformaldehído.

PRh: corteza perirrinal.

qRT-PCR: PCR cuantitativa con transcripción inversa.

RBD (dominio): dominio de unión a Ras.

RGS: regulador de la señalización de proteínas G.

RNA: ácido ribonucleico.

Rpl19: proteína ribosomal L19.

TIQ-A: tieno[2,3-c]isoquinolin-5(4H)-ona.

U0126: 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis (o-aminofenilmercapto) butadieno.

VDCC: canales de calcio dependientes de voltaje.

ZIP: péptido inhibidor de la proteína quinasa Mzeta.

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	145
1 Regulador de la señalización de las proteínas G 14 (RGS14)	147
2 RGS14₄₁₄, un variante de RGS14 por <i>splicing</i> alternativo	149
2.1 Memoria de reconocimiento de objetos y RGS14 ₄₁₄	150
2.1.1 Memoria de reconocimiento de objetos (ORM)	150
2.1.2 Papel de la RGS14 ₄₁₄ en la ORM	151
3 Implicación de la plasticidad sináptica hebiana de la corteza perirrinal en la memoria de reconocimiento	151
3.1 Proyecciones de la corteza perirrinal	151
3.2 Plasticidad sináptica hebiana en la corteza perirrinal	152
3.3 LTP/LTD en la memoria de reconocimiento	153
4 La pérdida de memoria en la enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento.....	153
4.1 Envejecimiento.....	153
4.2 Enfermedad de Alzheimer	154
5 Mecanismos implicados en la potenciación de la memoria	155
II. OBJETIVOS	161
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	165
1 Primer bloque experimental: Explorar el efecto de la proteína RGS14₄₁₄ en la recuperación de la pérdida de una memoria episódica	167
1.1 Diseño experimental	167
1.1.1 Efecto de RGS14 en envejecimiento.	167
1.1.2 Efecto de RGS14 en ratones transgénicos de la enfermedad de Alzheimer	168
1.2 Metodología	169
1.2.1 Preparación de lentivirus.....	169
1.2.2 Condiciones de estabulación y cirugía estereotáxica.....	182
1.2.3 Comprobación de la expresión de RGS14 ₄₁₄ mediante inmunofluorescencia.	185
1.2.4 Test de ORM.....	186
2 Segundo bloque experimental: Identificar las vías implicadas en la potenciación de la memoria mediada por RGS14₄₁₄	189
2.1 Diseño experimental	189
2.2 Metodología	192
2.2.1 Implantación de cánula e inyección de lentivirus	192
3 Tercer bloque experimental: Determinar la relación entre el efecto potenciador de la memoria mediado por la proteína RGS14₄₁₄ y los receptores AMPA	193

3.1	Diseño experimental	193
3.1.1	Análisis génico de los receptores AMPA	194
3.1.2	Análisis proteico de la expresión de la subunidad GluR2	194
3.2	Metodología	195
3.2.1	Diseción del área V2 de la corteza visual del cerebro de rata.....	195
3.2.2	qRT-PCR.....	195
3.2.3	Western Blot	201
4	Cuarto bloque experimental: Examinar el efecto del tratamiento con RGS14₄₁₄ sobre la plasticidad sináptica hebiana en la corteza perirrinal	203
4.1	Diseño experimental	203
4.1.1	Efecto del gen RGS14 ₄₁₄ en la corteza perirrinal sobre la ORM	204
4.1.2	Análisis del efecto de RGS14 ₄₁₄ en la plasticidad sináptica mediante registros extracelulares <i>in vitro</i> de potenciales de campo.....	205
4.2	Metodología	205
4.2.1	Electrofisiología en rodajas.....	205
5	Quinto bloque experimental: Analizar las áreas cerebrales implicadas en la potenciación de la memoria mediada por RGS14.....	211
5.1	Diseño experimental	211
5.1.1	Efecto de RGS14 ₄₁₄ sobre la ORM en las áreas V2, perirrinal y frontal	212
5.1.2	Estudio de la independencia de las áreas del cerebro implicadas en el procesamiento de ORM mediado por RGS14.....	212
5.2	Metodología	213
5.2.1	Tinción general de células con violeta de cresilo	213
IV.	RESULTADOS.....	215
1	Recuperación de la pérdida de memoria mediante estimulación por la proteína RGS14 en el área V2	217
1.1	Estudio en el envejecimiento	217
1.2	Estudio en la enfermedad de Alzheimer	218
2	Mecanismo de la acción potenciadora de la proteína RGS14.....	219
2.1	Implicación de los receptores AMPA/Kainato	220
2.2	Expresión dinámica de los receptores AMPA en animales-RGS	221
2.2.1	Aumento en la expresión génica de GluR2 y GluR4.....	221
2.2.2	Patrón de expresión proteica de GluR2 durante el procesamiento de la memoria de objetos.	222
2.3	Correlación entre ORM y la plasticidad sináptica en la corteza perirrinal	223
2.3.1	Aumento en la ORM mediado por RGS14 ₄₁₄ en la corteza perirrinal.....	223
2.3.2	Estudio de la plasticidad sináptica	224
3	Áreas independientes del cerebro implicadas en el procesamiento de la memoria de reconocimiento de objetos	230
3.1	Efecto potenciador de RGS14 sobre la ORM en las áreas V2, perirrinal y frontal	230
3.2	Domínios cerebrales independientes en el procesamiento de la ORM.....	232
3.2.1	Independencia del área V2 en la ORM	233
3.2.2	Independencia de la corteza perirrinal en la ORM	234
3.2.3	Independencia de la corteza frontal en la ORM.....	235

V. DISCUSIÓN.....	237
1 Recuperación de la pérdida de una memoria episódica en envejecimiento y AD..	239
2 El efecto de RGS14 está mediado por GluR2	240
3 RGS14 no facilita la plasticidad sináptica hebbiana	242
4 Áreas independientes del cerebro pueden promover la recuperación de la ORM mediada por RGS14.....	244
5 Mecanismo de la potenciación de la memoria mediada por RGS14 y la recuperación de la pérdida de ORM	245
VI. CONCLUSIONES.....	249
VII. BIBLIOGRAFÍA	253
VIII. APÉNDICES	267

I. Introducción

1 Regulador de la señalización de las proteínas G 14 (RGS14)

La señalización de las proteínas G comienza con una proteína G heterotrimérica ($G\alpha\beta\gamma$) (Albert & Robillard 2002; Neves et al 2002) unida a un receptor acoplado a proteínas G (GPCR). La activación de GPCR promueve la liberación de guanosín difosfato (GDP) y la consiguiente unión de guanosín trifosfato (GTP) para la activación de la subunidad $G\alpha$. Esta activación conlleva una disociación/reorganización del complejo heterotrimérico permitiendo la interacción de las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ con sus efectores y desencadenando así las cascadas de señalización intracelulares correspondientes. La subunidad $G\alpha$ que presenta una actividad GTPasa, rápidamente inicia su propia inactivación a través de la hidrólisis de GTP volviendo así a su estado de reposo ($G\alpha$ -GDP), uniéndose de nuevo a la subunidad $G\beta\gamma$ y reasociándose con el GPCR (Gilman 1987; Hamm 1998; Hepler & Gilman 1992). Este ciclo GTPasa de activación/desactivación de las proteínas G está regulado por miembros de la familia de reguladores de la señalización de las proteínas G (RGS). Las proteínas RGS contienen un dominio RGS canónico de ≈ 120 aminoácidos, el cual se une a proteínas G activadas actuando como proteínas activadoras de GTPasas (GAP) para catalizar la hidrólisis de GTP y acelerar de este modo el ciclo de las proteínas G (De Vries et al 2000; Hollinger & Hepler 2002; Ross & Wilkie 2000; Woodard et al 2015) (figura 1).

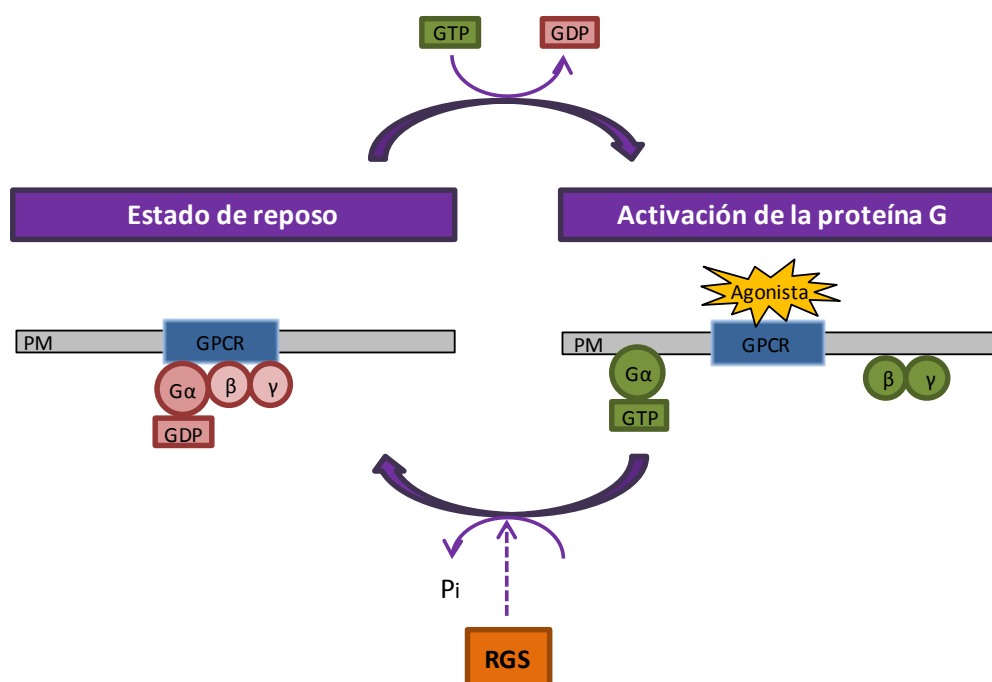


Figura 1. Diagrama de la activación de las proteínas G triméricas mediante la unión de un agonista a los receptores acoplados a proteínas G. GDP: guanosín difosfato; GTP: guanosín trifosfato; GPCR: receptor acoplado a proteína G; MP: membrana plasmática; P_i : fosfato; RGS: proteína reguladora de proteína G.

RGS14 es un miembro de la subfamilia R12 de las proteínas RGS que contiene varios dominios: un dominio N-terminal RGS de 119 aminoácidos (aa), un dominio C-terminal regulador de proteínas G (GPR; también conocido como GoLoco) de 22 aa y dos dominios centrales en tándem de unión a Ras (RBD), RBD1 y RBD2 de 70 aa cada uno (figura 2).



Figura 2. Esquema de la estructura de la proteína multidominio RGS14. Se indican los distintos dominios identificados de la proteína RGS14: Un dominio N-terminal RGS, dos dominios en tándem de unión a Ras (RBDs) y un dominio C-terminal regulador de las proteínas G (GPR). La numeración de amino ácidos (aa) se indica sobre la barra horizontal.

Por lo tanto, se cree que RGS14, además de participar en la hidrólisis de GTP mediada por el dominio RGS, participa en otras muchas funciones celulares. Esta idea está reforzada por el dinámico patrón de distribución de RGS14 a través de todo el cerebro. Experimentos de Northern blot (Snow et al 1997), estudios de hibridación *in situ* (Grafstein-Dunn et al 2001) y de reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR) (Larminie et al 2004) demostraron de forma independiente la presencia de mRNA de RGS14 en tejidos de cerebro de rata y humano. De igual manera, estudios de inmunohistoquímica (Lopez-Aranda et al 2006) y experimentos de inmunoblot (Hollinger et al 2001) han demostrado que la proteína RGS14 se encuentra de forma abundante en cerebro de rata y mono. En el cerebro adulto de ratón, el mRNA de RGS14 así como la proteína RGS14 se encuentran de forma predominante en las neuronas hipocampales de CA2, específicamente en espinas y dendritas (Lee et al 2010). Recientemente, un análisis anatómico detallado de la localización de RGS14 en cerebro de ratón ha demostrado que el mRNA de RGS14 así como la proteína RGS14 se encuentran reguladas a la alta durante el desarrollo posnatal de ratón, presentando la proteína RGS14 un patrón de expresión dinámico localizado en el hipocampo y la corteza olfatoria primaria en el cerebro adulto de ratón (Evans et al 2014). Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que RGS14 posee la capacidad única de interactuar con distintas formas de subunidades $G\alpha$. RGS14, al igual que las otras proteínas G, se une a las formas activas ($G\alpha$ -GTP) de la subfamilia $G\alpha i/o$ para estimular la hidrólisis de GTP mediada por $G\alpha$ (Cho et al 2000a; Hollinger et al 2001; Traver et al 2000; Traver et al 2004). A través del dominio GPR, RGS14 se une selectivamente a las formas inactivas $G\alpha i1$ -GDP o $G\alpha i3$ -GDP para inhibir la disociación de GDP y así dirigir RGS14 hacia la membrana plasmática (Kimple et al 2001; Mittal & Linder 2004; Shu et al 2007). Además, a través de su dominio RBD1, RGS14 se une

a H-Ras y Rap2 permitiendo así la participación de RGS14 en las vías de señalización de H-Ras (Mittal & Linder 2006; Shu et al 2010; Willard et al 2009). Hasta el presente, no se conocen moduladores de vías de señalización que se unan al dominio RBD2.

2 RGS14₄₁₄, un variante de RGS14 por *splicing* alternativo

El gen RGS14 (GenBank, NP_006471.2) codifica para la proteína humana de 566 aminoácidos (RGS14₅₆₆, Uniprot, O43566-7). Hasta el momento, Se han descrito tres variantes alternativas mediante *splicing* alternativo, sin embargo, no han sido aún caracterizadas completamente. Así, el gen de RGS14 (GenBank, AY987041) de 1245 pares de bases (bp) codifica para la isoforma 3 de la proteína RGS 14 de 414 aminoácidos (RGS14₄₁₄, Uniprot, O43566-5) (Lopez-Aranda et al 2006). La secuencia de esta isoforma (RGS14₄₁₄) difiere de la proteína original (RGS14₅₆₆) en que presenta una delección de los 153 primeros aminoácidos, una inserción de una lisina en la posición 352 además de un cambio del aminoácido valina, que se encuentra en la posición 416, por una alanina (figura 3).

RGS14 ₅₆₆	MPGKPKHLGVPNGRMVLAVSDGELSSTTGPQGGEGRGSLSIHSLSLPSGSPSPFPTEEQP	60
RGS14 ₄₁₄	-----	
RGS14 ₅₆₆	VASWALSFERLLQDPLGLAYFTEFLKKEFSAENVTFWKACERFQQIPASDTQQLAQEARN	120
RGS14 ₄₁₄	-----	
RGS14 ₅₆₆	IYQEFLLSSQALSFPVNI DRQAWLGEEVLAEP RPD MFRAQQ LQIFNLMKFDSYARFVKSPLY	180
RGS14 ₄₁₄	-----MFRAQQ LQIFNLMKFDSYARFVKSPLY	27
RGS14 ₅₆₆	RECLLAEAEGRPLREPGSSRLGSPDATTRKKPKLPGKSLPLGVEELGQLPPVEGPGGRPL	240
RGS14 ₄₁₄	RECLLAEAEGRPLREPGSSRLGSPDATTRKKPKLPGKSLPLGVEELGQLPPVEGPGGRPL	87
RGS14 ₅₆₆	RKSFRELGGTANAALRRESQGSLSNSASLDLGLFLAFVSSKSESHRKSLSGSTEGESESRP	300
RGS14 ₄₁₄	RKSFRELGGTANAALRRESQGSLSNSASLDLGLFLAFVSSKSESHRKSLSGSTEGESESRP	147
RGS14 ₅₆₆	GKYCCVYLPDGTASLALARPGLTIRDLMLAGICEKRGSLPDIKVVYLVGNEQALVLDQDC	359
RGS14 ₄₁₄	GKYCCVYLPDGTASLALARPGLTIRDLMLAGICEKRGSLPDIKVVYLVGNEQALVLDQDC	207
RGS14 ₅₆₆	TVLADQEVRLNRI TFELELTALERVVRI SAKPTKRLQEALQPILEKHGLSPLEAVLHRP	419
RGS14 ₄₁₄	TVLADQEVRLNRI TFELELTALERVVRI SAKPTKRLQEALQPILEKHGLSPLEAVLHRP	267
RGS14 ₅₆₆	GEKQPLDLGKLVSSVAAQRLVLDLTPGVKISKARDKSPCRSQGCPRTQDKATHPPPASP	479
RGS14 ₄₁₄	GEKQPLDLGKLVSSVAAQRLVLDLTPGVKISKARDKSPCRSQGCPRTQDKATHPPPASP	327
RGS14 ₅₆₆	SSLVKVPSSATGKRQTCDIEGLVELLN RVQSSGAHDQRGLLRKEDLVLPEFLQLPAQGPS	539
RGS14 ₄₁₄	SSLVKVPSSATGKRQTCDIEGLVELLN RVQSSGAHDQRGLLRKEDLVLPEFLQLPAQGPS	387
RGS14 ₅₆₆	SEETPPQTKSAAQPIGGSLSNSTTDSAL	566
RGS14 ₄₁₄	SEETPPQTKSAAQPIGGSLSNSTTDSAL	414

Figura 3. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de RGS14₄₁₄ (GenBank: AY987041) y RGS14₅₆₆ (GenBank: NP_006471.2). Los diferentes dominios están indicados en colores: el dominio RGS en amarillo; el dominio RBD1 en verde; el dominio RBD2 en azul y el dominio GPR en violeta. Los residuos diferentes se representan en rojo.

Por tanto considerando no solo la ausencia del dominio RGS que es crucial para la actividad GTPasa sino también la presencia de diferencias significativas a través de toda la secuencia, se puede afirmar que la proteína madura de RGS₄₁₄ es bastante distinta de la proteína RGS₁₄₅₆₆ tanto desde el punto de vista estructural como funcional, interviniendo posiblemente solo en funciones cerebrales no asociadas a la hidrólisis de GTP.

2.1 Memoria de reconocimiento de objetos y RGS₁₄₄₁₄

2.1.1 Memoria de reconocimiento de objetos (ORM)

La memoria de reconocimiento es uno de los ejemplos más estudiados de memoria declarativa. Es el proceso por el cual se identifica algo (por ejemplo un objeto o persona) que ha sido visto previamente. Generalmente se considera que la memoria de reconocimiento está constituida por dos componentes, recolección y familiaridad (Diana et al 2007; Yonelinas 2001; Yonelinas et al 2010). El interés en la distinción entre estos dos componentes aumentó enormemente cuando Brown and Aggleton (Brown & Aggleton 2001) propusieron una base neuroanatómica para estos dos procesos en la cual la recolección dependía del hipocampo, mientras que la familiaridad dependía de la corteza perirrinal adyacente. Este modelo de proceso-dual está basado en el reconocimiento de procesos funcionalmente distintos, aunque se sigue debatiendo sobre qué regiones del lóbulo temporal medial (MTL) son necesarias para llevar a cabo estos procesos (Eichenbaum et al 2007). Sin embargo, otros científicos están de acuerdo en que la memoria de reconocimiento es un proceso único dependiente tanto del hipocampo como de las cortezas adyacentes (Donaldson 1996; Haist et al 1992; Squire et al 2004; Squire et al 2007) manifestando que la memoria de reconocimiento es un proceso basado en la familiaridad, donde “reconocer” refleja memorias débiles y “recordar” está asociado a memorias fuertes.

Se ha propuesto que, además de la corteza perirrinal (Brown & Aggleton 2001; Kim et al 2014; Lech & Suchan 2013; Martin et al 2013; Ranganath & Ritchey 2012; Warburton & Brown 2010; Watson & Lee 2013), existen otras áreas corticales implicadas en el circuito de la ORM tales como la corteza frontal (Banks et al 2012; Swick & Knight 1999; Warburton & Brown 2010) o más recientemente el área V2 de la corteza visual (Lopez-Aranda et al 2009). Hasta ahora, se pensaba que el área V2 participaba en la percepción visual y no en la memoria. Sin embargo, estudios recientes desarrollados en nuestro laboratorio sobre el papel del área V2, área localizada fuera del MTL, en la ORM no solo puso esta área en el foco de

atención, sino que apoyó el punto de vista que considera la corriente visual ventral hacia hipocampo, y no sólo el MTL, importante para el procesamiento de la memoria (Bussey & Saksida 2005; 2007; Gaffan 2002; Murray et al 2007).

2.1.2 Papel de la RGS14₄₁₄ en la ORM

Un estudio previo desarrollado en nuestro laboratorio (Lopez-Aranda et al 2009) ha demostrado que el área V2, un área localizada fuera del MTL, juega un papel crítico en la ORM a corto y a largo plazo. La estimulación del área V2 mediante la sobreexpresión de RGS14₄₁₄ dio lugar a un fuerte aumento de la memoria. Este efecto en la ORM fue de tal magnitud que una ORM normal, con una duración de hasta 45 min (corto plazo), se convirtió en una memoria a largo plazo que podía ser trazada incluso después de varios meses. Una eliminación selectiva de las neuronas del área V2 conllevó no solo a la pérdida completa de la ORM normal sino también de la potenciación de la ORM mediada por esta proteína.

Por otro lado, se demostró que la capacidad de retener la información sobre varios objetos fue más alta en los animales RGS14. Así, los animales normales podían retener la información de dos objetos diferentes pero eran incapaces de hacer lo mismo en el caso de cuatro objetos, mientras que los animales RGS14 fueron capaces de retener la información de seis objetos. Además, se observó que el efecto del tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ persistía durante el resto de la vida de la rata. Por tanto, estos hallazgos sugieren que RGS14₄₁₄ es un fuerte potenciador de la memoria el cual podría ser un buen candidato terapéutico como tratamiento frente a su pérdida.

3 Implicación de la plasticidad sináptica hebiana de la corteza perirrinal en la memoria de reconocimiento

3.1 Proyecciones de la corteza perirrinal

La corteza perirrinal en rata está compuesta por las áreas de Brodmann 35-36 y se localiza a lo largo del surco rinal (Burwell 2001; van Strien et al 2009). Aunque las proyecciones corticales aferentes más importantes hacia la corteza perirrinal son aquellas originadas en la corteza entorrinal (Burwell & Amaral 1998b; Canto et al 2008; Insausti et al 1997), la corteza temporal asociativa también envía un gran número de proyecciones hacia la

corteza perirrinal (Burwell & Amaral 1998a). La corteza perirrinal recibe por tanto información de los sistemas sensoriales a través de la corteza temporal, e información de la formación hipocampal a través de la corteza entorrinal. La entrada de información desde las cortezas entorrinal y temporal colindantes terminan en gran medida en las capas I, II Y III de la corteza perirrinal (Agster & Burwell 2013; Furtak et al 2007).

3.2 Plasticidad sináptica hebiana en la corteza perirrinal

La plasticidad sináptica hebiana se refiere específicamente a la modificación dependiente de actividad de la fuerza o eficacia de la transmisión sináptica en las sinapsis preexistentes (Citri & Malenka 2008; Feldman 2009). Las formas más importantes de plasticidad sináptica observadas en las sinapsis excitatorias son la potenciación a largo plazo (LTP), definida como un incremento persistente en la respuesta sináptica inducida por una estimulación breve de alta frecuencia; y la depresión a largo plazo (LTD) que consiste en una disminución de la respuesta sináptica inducida por episodios más largos de estimulación de baja frecuencia. Existen diferentes mecanismos en la corteza perirrinal que contribuyen a la plasticidad sináptica. Estos incluyen la activación de los receptores NMDA, los receptores mGlu, los receptores colinérgicos muscarínicos y los canales de calcio dependientes de voltaje (consultar Banks et al 2012; Banks et al 2014; Kealy & Commins 2011). Una estimulación de alta frecuencia (HFS) a 100 Hz en las neuronas de las capas II/III de la corteza perirrinal produce una LTP dependiente de receptores NMDA (Bilkey 1996), y una estimulación tetánica y *theta-burst* a 100 Hz en las capas II/III producen también una LTP dependiente de receptores NMDA en las neuronas de la capa I (Ziakopoulos et al 1999). Sin embargo, una estimulación de baja frecuencia (LFS) a 1 Hz y 5 Hz pueden inducir una reversión de la LTP (despotenciación) y una LTD dependientes de los receptores NMDA respectivamente (Aicardi et al 2004; Massey et al 2004). Además de la LTD dependiente de la neurotransmisión glutamatérgica, existen otras formas de LTD en la corteza perirrinal. Se ha demostrado que un amplio abanico de antagonistas tanto de receptores mGlu (específicos para los grupos de receptores mGlu I, II y III) (Cho et al 2000b; McCaffery et al 1999) como de receptores colinérgicos muscarínicos M1 (Massey et al 2001) pueden producir también una LTD en la corteza perirrinal sin necesidad de una estimulación eléctrica o activación de receptores NMDA.

3.3 LTP/LTD en la memoria de reconocimiento

Los patrones de plasticidad sináptica a largo plazo han sido propuestos como responsables de múltiples formas de cognición, incluida la memoria de reconocimiento (Abraham & Robins 2005; Bliss & Collingridge 1993; Collingridge et al 2010; Davis et al 1992; Griffiths et al 2008; Martin & Morris 2002; Morris et al 1986; Whitlock et al 2006). En particular, La LTD dependiente de la corteza perirrinal ha sido foco de gran interés como potencial sustrato para la memoria de reconocimiento. Muchas de las sustancias que bloquean la LTD pero no la LTP, también producen un fallo en la memoria de reconocimiento *in vivo* (Barker et al 2006; Griffiths et al 2008; Seoane et al 2009; Warburton et al 2003). En la siguiente revisión bibliográfica, Banks et al 2012 se recogen las evidencias sobre la implicación de distintas vías de señalización en los mecanismos de la plasticidad en la corteza perirrinal y la memoria de reconocimiento.

4 La pérdida de memoria en la enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento

La memoria episódica es una de las más estudiadas en la neurociencia de la cognición debido a su importancia clínica. Su función se ve claramente afectada con el envejecimiento cerebral y las enfermedades psiquiátricas (Dere et al 2010) y neurodegenerativas como pueden ser la enfermedad de Parkinson (Williams-Gray et al 2006) y la enfermedad de Alzheimer (AD). Aquí nos centraremos en la pérdida de memoria episódica en el envejecimiento y en la AD, dos condiciones representativas de la pérdida de memoria en humano. Estos dos modelos además, formarán parte de mi trabajo de tesis doctoral.

4.1 Envejecimiento

Aunque la mayoría de los estudios sobre la pérdida de memoria se centran en la AD como veremos más adelante, el envejecimiento en ausencia de esta patología implica también un déficit de la memoria episódica (Drag & Bieliauskas 2010; Nyberg et al 2012; Shing et al 2010). Esta pérdida de memoria episódica detectada en el envejecimiento normal está asociada a una reducción del volumen del hipocampo y otras estructuras del MTL (Fjell et al 2014; Nyberg et al 2012; Persson et al 2012; Rodrigue & Raz 2004). Sin embargo, debido

también a una atrofia sustancial en la corteza prefrontal (Fjell et al 2009; Raz et al 2005) acompañada del fallo en determinadas funciones cognitivas, se ha propuesto que la disminución de la eficiencia del circuito fronto-estriatal sea la responsable del déficit de memoria observado en el envejecimiento (Buckner 2004; Head et al 2005).

La plasticidad sináptica sufre cambios durante el proceso de envejecimiento en el hipocampo y en el neocortex (Burke & Barnes 2006; Foster 2007). La inducción de la LTP se ve alterada en animales envejecidos cuando la estimulación es débil pero no al utilizar una HFS de alta intensidad (Diana et al 1994a; Diana et al 1994b; Dieguez & Barea-Rodriguez 2004). Los animales envejecidos muestran o bien un umbral más alto para la inducción de LTP (Barnes et al 2000; Barnes et al 1996) o bien un nivel disminuido de inducción de LTP en comparación con animales jóvenes (Deupree et al 1991; Moore et al 1993; Rosenzweig et al 1997; Tombaugh et al 2002). Por el contrario, la capacidad de inducción de la LTP o despotenciación es mayor en animales viejos que en animales jóvenes (Foster & Norris 1997; Norris et al 1996).

4.2 Enfermedad de Alzheimer

El deterioro de la memoria episódica es el síntoma clínico principal de la AD siendo uno de los síntomas más tempranos de esta enfermedad. Por tanto el principal objetivo es identificar estos cambios cognitivos tempranos durante el curso de la misma, lo que permitiría el inicio de terapias en pacientes cuando se espera obtener el máximo beneficio (Didic et al 2011; Dubois et al 2007; Salmon 2012). Actualmente, el déficit de la memoria episódica observado en la AD está asociado con la atrofia de la corteza entorrinal y el hipocampo (Acosta-Cabronero et al 2010; Killiany et al 2002; Petersen 2000). Cabe destacar que la patología neurofibrilar de la AD afecta a la parte medial de la corteza perirrinal antes de extenderse a la corteza entorrinal y el hipocampo (Braak & Braak 1991; 1995; Gertz et al 1998; Taylor & Probst 2008), lo que sugiere que la evaluación de las funciones cognitivas asociadas con la corteza perirrinal podría ser también importante a la hora de la detección temprana de la AD.

Se ha demostrado que la proteína beta-amiloide ($A\beta$) inhibe la LTP mientras que potencia la LTD en roedores (Cheng et al 2009; Kim et al 2001; Li et al 2009; Shankar et al 2008). Sin embargo, el efecto de $A\beta$ sobre la LTP parece depender altamente de la concentración ya que, de hecho, bajos niveles de $A\beta$ pueden facilitar el mantenimiento de la LTP (Puzzo et al 2011;

Puzzo et al 2008). Además, desafortunadamente, los estudios sobre la LTP en modelos de ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer han generado resultados contradictorios. Varios grupos de investigación encontraron una disminución de la LTP (Chong et al 2011; Gong et al 2004; Knobloch et al 2007; Saganich et al 2006; Sydow et al 2011; Trinchese et al 2004), mientras otros observaron que la LTP no se veía afectada (Chapman et al 1999; Fitzjohn et al 2010; Gureviciene et al 2004; Harris et al 2010; Marchetti & Marie 2011; Palop et al 2007).

5 Mecanismos implicados en la potenciación de la memoria

Muy poco se conoce de los mecanismos que intervienen en la potenciación de la memoria mediada por RGS14₄₁₄. Estudios *in vitro* han demostrado previamente la participación de la proteína RGS14₄₁₄ en la regulación de los niveles intracelulares de Ca²⁺ (Martin-Montanez et al 2010), un proceso considerado esencial en la plasticidad sináptica y la formación de la memoria (ver Baker et al 2013). Mediante el uso de dos líneas celulares de diferente origen neuronal y dos métodos diferentes de medida de Ca²⁺ intracelular, se demostró que la expresión de la proteína RGS14₄₁₄ en estas líneas celulares redujo considerablemente la entrada de Ca²⁺ siendo dependiente de los canales tipo Cav1 sensibles a nifedipina. Sin embargo, queda por demostrar cómo la prevención de altos niveles de Ca²⁺ en el citoplasma mediante la disminución de la entrada de Ca²⁺ a través de los canales Cav1 puede traducirse en una mejora de la memoria.

No obstante, a diferencia de lo que ocurre con RGS14₄₁₄, se ha producido un enorme progreso en la comprensión de los mecanismos implicados en el procesamiento de la memoria (Lee & Silva 2009; Stern & Alberini 2013). Dada la gran variedad de estudios desarrollados sobre diversos compuestos farmacológicos y vías de señalización implicados en la modulación de la memoria, nos centraremos únicamente en aquellos que formarán parte de este trabajo de tesis doctoral.

Receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPArs). Los receptores AMPA son receptores ionotrópicos de glutamato permeables a cationes que se expresan a lo largo de todo el cerebro (Beneyto & Meador-Woodruff 2004). Existen cuatro subunidades de receptores AMPA (GluA1-GluA4 ó GluR1-GluR4) altamente homólogas (Collingridge et al 2004) y que se ensamblan como dímeros para formar heterotetrámeros (Hollmann & Heinemann 1994; Traynelis et al 2010). Algunos estudios han demostrado

también la existencia de homotetrámeros (Lu et al 2009; Wenthold et al 1996). Existen evidencias sobre la implicación de la endocitosis de los receptores AMPA en la memoria de objetos dependiente de la corteza perirrinal en ratas (Griffiths et al 2008; Winters & Bussey 2005). Se ha visto también que el bloqueo de los receptores AMPA en dicha corteza produce un fallo en la memoria de reconocimiento en macacos (Malkova et al 2015). GluR2 es la subunidad más abundante de los receptores AMPA en el adulto y la gran mayoría de los receptores AMPA que contienen esta subunidad son impermeables al Ca^{2+} (99%) (Greger et al 2003) y muestran baja conductancia del canal (Cull-Candy et al 2006; Traynelis et al 2010). Sin embargo, los receptores AMPA que carecen de la subunidad GluR2 son permeables al Ca^{2+} y presentan una alta conductancia del canal (Swanson et al 1997). Se conoce que esta subunidad juega un papel crucial en la plasticidad sináptica y la memoria (Czarkoff & Howland 2011; Mead & Stephens 2003; Miguez et al 2010). La expresión de la subunidad GluR4 se distribuye a través del sistema nervioso central, pero es relativamente más alta en el hipocampo, la corteza cerebral y las células granulares del cerebelo (Keinanen et al 1990). En el hipocampo, los altos niveles de expresión de GluR4 se restringen a la primera semana posnatal en la cual la subunidad GluR4 media la liberación de los receptores AMPA que contienen la subunidad GluR2 (Zhu et al 2000). Ratones *knockout* para la subunidad GluR4 muestran una mejor memoria espacial de trabajo aunque sin ninguna alteración en la LTP lo que sugiere una implicación de GluR4 en funciones cognitivas (Sagata et al 2010).

Receptores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDARs). Los receptores NMDA son heterómeros (Dingledine et al 1999) compuestos por dos subunidades NR1 (Behe et al 1995) esenciales y dos o tres subunidades NR2 (Laube et al 1998; Premkumar & Auerbach 1997). Se han descrito cuatro subunidades NR2 (A-D) aunque las subunidades NR2A y NR2B son las predominantes en el cerebro anterior. Existen evidencias sobre la implicación de los receptores NMDA en la ORM dependiente de la corteza perirrinal en macacos (Malkova et al 2015) y ratas (Abe et al 2004; Winters & Bussey 2005).

Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs). La familia de receptores mGluR está constituida por ocho subtipos receptoriales (mGluR1-8) clasificados en tres grupos en base a la homología en sus secuencias, el perfil farmacológico y las vías de transducción de señales implicadas (Conn & Pin 1997); grupo I (formado por mGluR1 y mGluR5), grupo II (mGluR2 y mGluR3), y grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, y mGluR8). Estudios previos donde se investiga el papel de los grupos I y II en el aprendizaje y

la memoria, han demostrado la implicación de estos receptores en la adquisición de la ORM a largo plazo, pero no en la consolidación o recuperación de la información (Barker et al 2006).

Receptores colinérgicos muscarínicos (mAChRs). Los cinco subtipos de receptores mACh pertenecen a la superfamilia de receptores de siete hélices transmembrana, los cuales activan a proteínas G triméricas con dominios de unión a nucleótidos de guanina (Bonner et al 1987). Se ha demostrado la existencia de un fallo en la ORM mediante la administración de antagonistas de receptores de mACh (Abe et al 2004; Tinsley et al 2011; Warburton et al 2003). Además otros estudios han confirmado que este fallo en la memoria se produce en concreto mediante el antagonismo de los receptores muscarínicos M1 (Tinsley et al 2011).

Canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs). Los VDCC se subdividen en varias subfamilias dependiendo de sus propiedades farmacológicas. De este modo los VDCC incluyen los canales tipo L (la familia tipo Cav1), los canales tipo T (familia Cav3) y los canales tipo P/Q, R y N (familia Cav2) (Catterall et al 2005). Los VDCC tipo L son la mayor fuente de entrada de iones de calcio a las neuronas (Berger & Bartsch 2014; Chittajallu et al 1998). La inactivación temporal de estos canales produce un fallo en el aprendizaje de evitación pasiva condicionado por miedo, en la memoria espacial y la memoria de reconocimiento de objetos (Bauer et al 2002; Borroni et al 2000; Lashgari et al 2006; Seoane et al 2009; Winters et al 2007; Woodside et al 2004).

Proteína quinasa M ζ (PKM ζ). La PKM ζ es una isoforma de la proteína quinasa C (PKC) que contiene un dominio catalítico ζ y que carece del dominio N-terminal regulador, lo que hace de la PKM ζ una isoforma activa de forma constitutiva (Sacktor 2011). Esta proteína se expresa exclusivamente en el cerebro y se encuentra de forma abundante en el hipocampo y la neocorteza (Hernandez et al 2003; Oster et al 2004). La PKM ζ juega un papel importante en la memoria dependiente de hipocampo (Hardt et al 2010; Hernandez et al 2003; Serrano et al 2008) y ejerce sus funciones mediante el bloqueo de la vía dependiente de GluA2 que interviene en la internalización de los receptores AMPA postsinápticos, promoviendo así la expresión persistente de GluA2 en las sinapsis (Migues et al 2010). A diferencia de muchas otras moléculas de corto periodo de activación implicadas en la formación de memoria, la proteína PKM ζ es única al presentar una actividad persistente no solo esencial para la formación de la memoria sino también para su posterior almacenamiento (Sacktor 2011; Shema et al 2011; Shema et al 2009). Sin embargo un estudio reciente (Volk et al 2013) ha

refutado este modelo de formación de memoria y ha demostrado que PKM ζ no es necesaria ni para la plasticidad sináptica hipocampal ni para el aprendizaje y la memoria.

Proteína quinasa II dependiente de Ca²⁺ / Calmodulina (CaMKII). CaMKII es una serina/treonina quinasa multifuncional con un amplio rango de sustratos. En mamíferos, existen múltiples isoformas de CaMKII como productos de cuatro genes estrechamente relacionados α , β , γ y δ (Lucchesi et al 2011). Las isoformas α y β se localizan principalmente en el cerebro, mientras que las isoformas γ y δ se expresan de forma ubicua. La isoforma α CaMKII se expresa en el cerebro anterior donde constituye la principal proteína presente en la densidad postsináptica (PSD) (Cheng et al 2006). Se sabe muy poco acerca de la función de la β CaMKII en el cerebro y prácticamente nada acerca de las isoformas γ y δ . El papel de la proteína CaMKII ha sido ampliamente estudiado en relación a la formación de la memoria. Se ha demostrado que la actividad de CaMKII aumenta durante la formación de la memoria al igual que se ha confirmado un fallo considerable en dicho proceso al bloquear esta proteína (Coultrap & Bayer 2012; Elgersma et al 2004; Irvine et al 2006; Lisman et al 2002; Lucchesi et al 2011; Tinsley et al 2009; Wayman et al 2008).

Señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno quinasa (MAPKK). La MAPKK también conocida como MEK, es una enzima quinasa encargada de la fosforilación de las proteínas quinasas (MAPKs) quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), p38 y JNK. Estas MAPKKs son parte de una cascada de señalización en la cual una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK) activa una MAPK quinasa que a su vez activa una MAPK. Se han identificado hasta el momento siete subtipos de MEK: MEK1 y MEK2 que están estrechamente relacionados y que activan a ERK1/2 participando así en la cascada de transducción de señales Ras/Raf/MEK/ERK; MEK3 y MEK6 que son similares funcionalmente y que activan a p38 MAP quinasa; MEK4 y MEK7 que actúan sinérgicamente activando a la proteína quinasa JNK y finalmente MEK5 que activa a ERK5, conocida también como la gran MAP quinasa 1 (BMK1). Al ser activadas, las MAPKKs pueden fosforilar a una variedad de dianas intracelulares incluyendo a factores de transcripción, proteínas adaptadoras de la transcripcionales, sustratos de membrana y de citoplasma así como otras quinasas (Akinleye et al 2013). Numerosos estudios han demostrado que la activación de las MAPKKs es esencial para la formación de la memoria. La inhibición farmacológica de MEK produce un fallo en la consolidación de la memoria a largo plazo incluyendo el reconocimiento de objetos, demostrando así que la activación de

ERK es necesaria para la formación de la memoria (Berman et al 2000; Davis & Laroche 2006; Hebert & Dash 2002; Kelly et al 2003; Leon et al 2010; Lu et al 2001; Schafe et al 2000; Shalin et al 2004).

Poli[ADP]-ribosilación. Se trata de una modificación post-transcripcional de proteínas nucleares catalizada por poli[ADP]-ribosa polimerasas (PARPs) (Ame et al 2004; Lautier et al 1993; Rouleau et al 2004; Schreiber et al 2006). En el núcleo, la poli[ADP]-ribosilación catalizada por PARP-1 altera las interacciones proteína-proteína y proteína-DNA, y está implicada en la remodelación de la cromatina así como en la transcripción y reparación del DNA (Ju et al 2004; Rouleau et al 2004). PARP-1 también actúa dentro de la cascada de ERK que interviene en el crecimiento y diferenciación (Cohen-Armon 2007; Cohen-Armon et al 2007). Resultados previos han relacionado la activación de PARP-1 con la formación de memoria a largo plazo (Cohen-Armon et al 2004; Goldberg et al 2009) así como con la consolidación de la memoria (Fontan-Lozano et al 2010). Además, un estudio reciente muestra que NGF promueve la plasticidad sináptica y la formación de memoria a largo plazo mediante la activación de la poli[ADP]-ribosilación mediada por la proteína PARP-1 además de la activación de la vía PKA-CREB (Wang et al 2012).

La figura 4 resume las vías de señalización implicadas en la memoria de reconocimiento. Para mayor detalle, consultar el *poster* de la casa comercial Tocris bajo el nombre *Neurotransmitters of Synaptic Plasticity, Learning and Memory in the Perirhinal Cortex* de Warburton & Bashir, 2011.

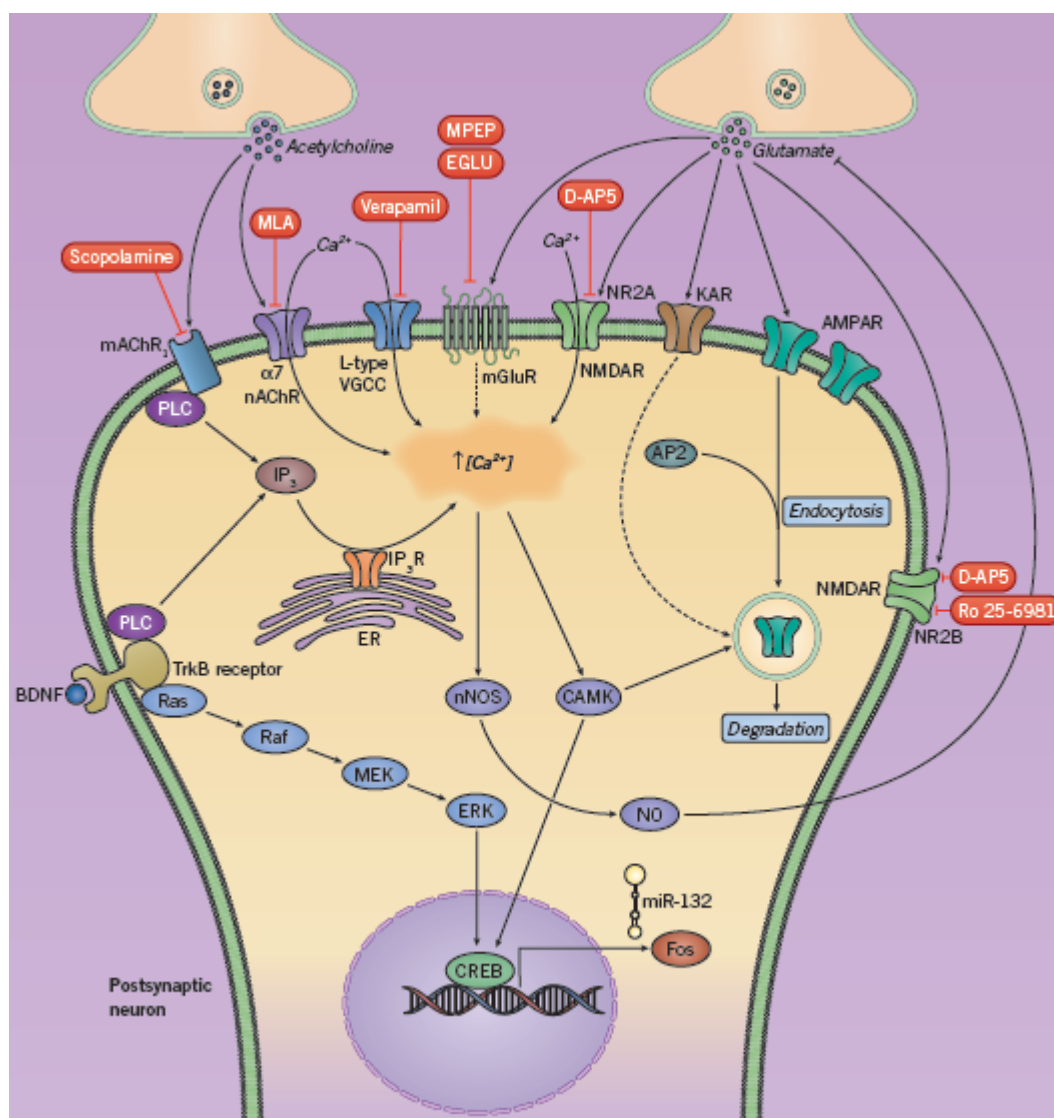


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos celulares de la memoria de reconocimiento (imagen tomada de Tocris).

II. Objetivos

Se ha demostrado previamente el papel de la proteína RGS14₄₁₄ como potenciador de la memoria ya que el tratamiento con su correspondiente gen en el área V2 de cerebros de roedores producía un aumento notable de la memoria de reconocimiento de objetos, uno de los ejemplos más estudiados de memoria episódica. Por tanto, planteamos comprobar si la pérdida de memoria de reconocimiento de objetos observada en modelos de animales envejecidos y transgénicos de la enfermedad de Alzheimer, podía ser recuperada o no mediante el mismo tratamiento con el gen RGS14₄₁₄. A continuación, exploramos distintos procesos biológicos cerebrales con el propósito de aportar una posible explicación a esta potenciación de la memoria mediada por RGS en ratas.

Objetivo 1: Explorar el efecto de la proteína RGS14₄₁₄ en la recuperación de la pérdida de una memoria episódica

Una gran variedad de enfermedades neurológicas y psiquiátricas se asocian con deficiencias de aprendizaje y memoria. Tanto la enfermedad de Alzheimer como el deterioro cognitivo relacionado con la edad son claros ejemplos de ello (ver apartado I.4). Utilizando dos modelos de roedores que presentan déficit de memoria, ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer (AD) y ratas envejecidas, hemos evaluado si el tratamiento con el gen RGS14 podía ser una terapia efectiva frente a la pérdida de la memoria.

Objetivo 2: Identificar las vías implicadas en la potenciación de la memoria mediada por RGS14₄₁₄

Se está realizando un gran esfuerzo en nuestro laboratorio para comprender los mecanismos que intervienen en la potenciación de la memoria mediada por RGS14. En este trabajo, hemos llevado a cabo una serie de estudios farmacológicos empleando distintos antagonistas e inhibidores para elucidar las vías que podrían estar implicadas en el aumento de la memoria observado tras el tratamiento con RGS14.

Objetivo 3: Determinar la relación entre el efecto potenciador de la memoria mediado por la proteína RGS14₄₁₄ y los receptores AMPA

Puesto que en el objetivo 2, identificamos la implicación de los receptores AMPA en el aumento de la memoria, y teniendo en cuenta además la implicación de estos receptores en

el procesamiento de la memoria de reconocimiento de objetos (Griffiths et al 2008; Malkova et al 2015; Winters & Bussey 2005), decidimos centrarnos en el estudio de estos receptores y evaluar su participación en el procesamiento de la ORM en animales RGS.

Objetivo 4: Examinar el efecto del tratamiento con RGS14₄₁₄ sobre la plasticidad sináptica hebiana en la corteza perirrinal

Dada la extensa literatura que describe la plasticidad sináptica como sustrato potencial para la memoria de reconocimiento, quisimos determinar si la neuroplasticidad podría estar implicada en el efecto de mejora de la memoria mediado por RGS14 observado. Para ello se llevaron a cabo estudios electrofisiológicos en cortes de cerebro de ratas tratadas con RGS que contenían la corteza perirrinal, una estructura crucial en el procesamiento de la ORM.

Objetivo 5: Analizar las áreas cerebrales implicadas en la potenciación de la memoria mediada por RGS14

En este objetivo, hemos examinado la interrelación entre el área V2 y las cortezas perirrinal y frontal, áreas que forman parte del circuito de ORM en el cerebro. En un primer lugar evaluamos el efecto del tratamiento con RGS14 sobre la ORM en estas áreas para más tarde determinar si un daño sustancial sobre dichas áreas podía producir de forma independiente una pérdida de la ORM y así simular las condiciones encontradas en enfermedades neurodegenerativas y/o el envejecimiento. Además, hemos explorado si el tratamiento con RGS14 sobre una de las áreas en estas condiciones de déficit de ORM (similares a las observadas en los modelos de roedores en el objetivo 1), era capaz de normalizar esta pérdida de memoria sufrida o no.

III. Material y métodos

1 Primer bloque experimental: Explorar el efecto de la proteína RGS14₄₁₄ en la recuperación de la pérdida de una memoria episódica

1.1 Diseño experimental

En este bloque se pretende evaluar el efecto del tratamiento sobre el área V2 con el gen RGS14₄₁₄ en dos modelos diferentes de animales con déficit de memoria (ratas envejecidas y ratones transgénicos de la enfermedad de Alzheimer, AD) empleando para ello el test de memoria de reconocimiento de objetos (ORM) (figura 5).

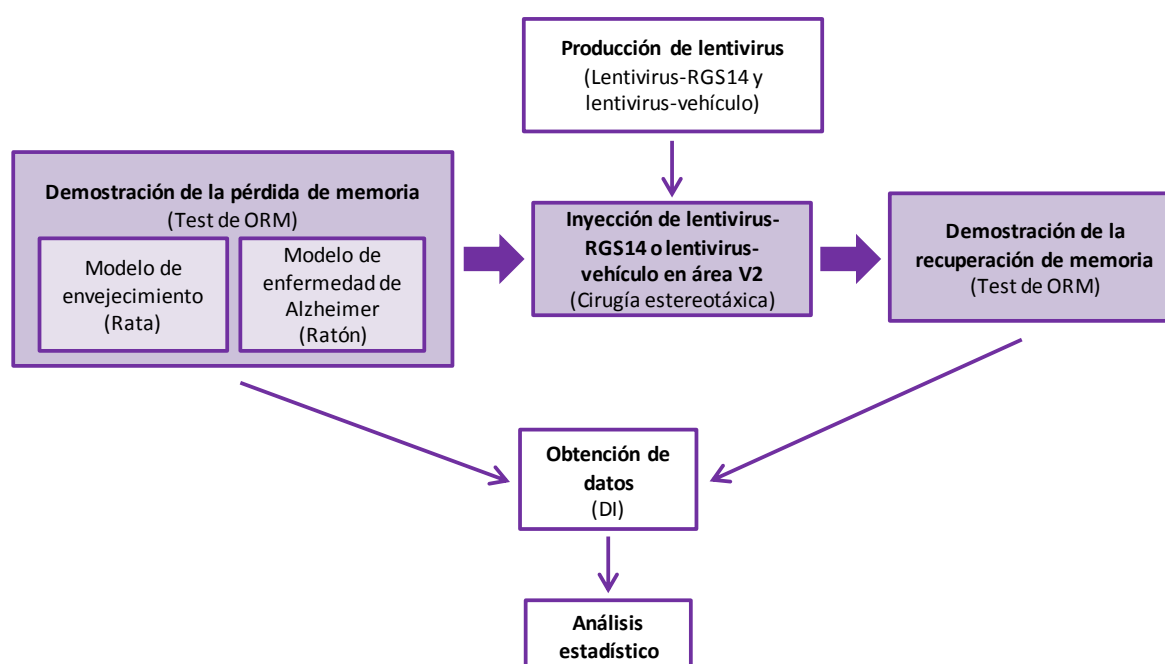


Figura 5. Esquema del diseño experimental.

1.1.1 Efecto de RGS14 en envejecimiento

Para lograr este objetivo, se emplearon ratas macho Wistar Han (Charles River) de edades comprendidas entre 3 y 24 meses, desarrollándose un test de ORM (apartado III.1.2.4) en 2 fases:

(i) Demostración de la pérdida de memoria en ratas envejecidas: Se llevó a cabo el test de ORM con tiempos de demora de 45 min y 24 h en 16 ratas de 3 meses de edad. Al alcanzar los 18 meses en estos animales, y para demostrar la pérdida de memoria sufrida en los mismos, se repitió la prueba con un tiempo de demora de 45 min.

(ii) Estudio de la recuperación de la memoria perdida mediante la sobreexpresión de la proteína RGS14: Una vez realizada la prueba a los 18 meses de edad, en 7 de las 16 ratas (grupo-RGS14) se inyectó lentivirus-RGS14₄₁₄ en el área V2 de la corteza visual (apartados III.1.2.1 y III.1.2.2.2) y las 9 ratas restantes (grupo-vehículo) fueron tratadas con lentivirus-vehículo. A los 20 y 24 meses de edad, se repitió el test de ORM con tiempos de demora de 45 min y/o 24 h.

1.1.2 Efecto de RGS14 en ratones transgénicos de la enfermedad de Alzheimer

En este estudio se emplearon ratones J20 con la mutación hAPP_{swe-ind} (cepa B6.Cg-Tg(PDGFB-APP^{SwInd})20Lms/2Mmjax de Jackson Laboratory) de entre 2 y 10 meses que sobreexpresan la proteína precursora amiloide humana (hAPP) con las mutaciones de la enfermedad de Alzheimer familiar Swedish (K670N/M671L) e Indiana (V717F) bajo el control del promotor del factor de crecimiento derivado de plaquetas de cadena β (PDGF) (Mucke et al 2000). Este modelo presenta a partir de los 4 meses de edad una pérdida de memoria (Escribano et al 2009). Como controles, se utilizaron ratones *wild-type* de la cepa C57BL/6J de las mismas edades. Este diseño experimental, consta también de una primera fase de demostración de la pérdida de memoria episódica y una segunda fase de demostración de la recuperación de la memoria mediante la sobreexpresión de la proteína RGS14.

(i) En la primera fase, se emplearon dos grupos de ratones con 2 meses de edad: un grupo *Wild-type* control formado por 16 ratones C57BL/6J y un grupo-AD formado por 12 ratones J20. A ambos grupos se les realizó un test de ORM a los 2 y 4 meses de edad (apartado III.1.2.4).

(ii) En la segunda fase, se utilizaron, además de los grupos anteriores, otros dos grupos de ratones: un grupo AD+RGS14 formado por 15 ratones J20 tratados con lentivirus-RGS14₄₁₄ y un grupo AD+vehículo de 8 ratones J20 inyectados con lentivirus-vehículo, ambos en el área V2 de la corteza visual (apartados III.1.2.1 y III.1.2.2.2). En los 4 grupos se llevó a cabo un test de ORM a los 7 y 10 meses de edad.

1.2 Metodología

1.2.1 Preparación de lentivirus

En la figura 6, se muestra el esquema de trabajo seguido para la preparación de lentivirus.

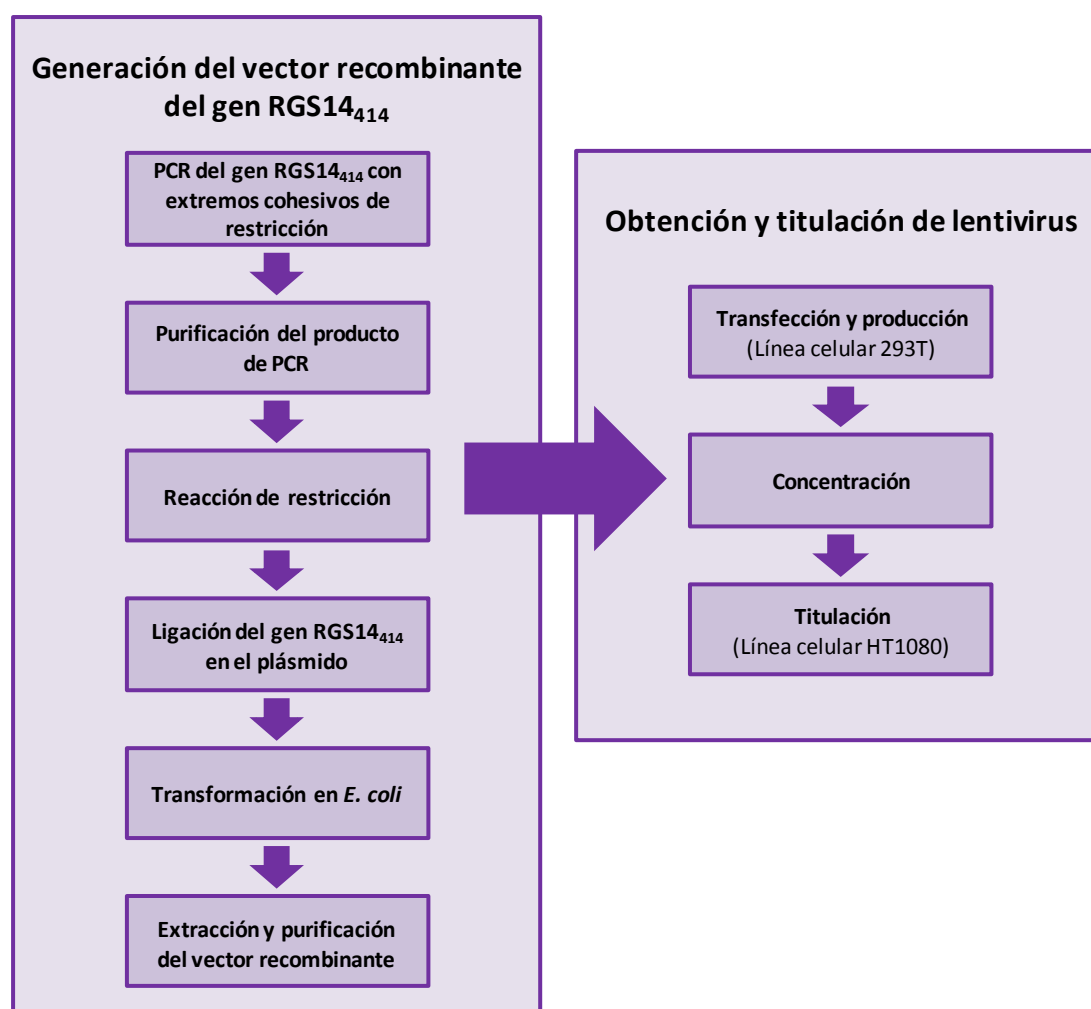


Figura 6. Esquema de la preparación de lentivirus.

1.2.1.1 Generación del vector recombinante del gen

1.2.1.1.1 cDNA del gen RGS14₄₁₄

Se trata de un cDNA (GenBank, AY987041) (Lopez-Aranda et al 2006) de 1245 pares de bases (bp) que codifica para la isoforma 3 de la proteína humana reguladora de la señalización de las proteínas G 14, de 414 aminoácidos (RGS14₄₁₄, Uniprot, O43566-5) (ver apartado I.2).

1.2.1.1.2 Plásmido pLVX-DsRed-Monomer-C1

El cDNA del gen RGS14₄₁₄ se insertó en el plásmido *pLVX-DsRed-Monomer-C1* (Clontech, 632153). Vector comercial compuesto por 8800 bp que expresa una proteína monomérica mutante de la proteína roja fluorescente de *Discosoma sp.* (DsRed). La expresión de esta proteína se regula mediante el promotor constitutivo de los genes inmediatamente tempranos de *citomegalovirus* humano (P_{CMV IE}), localizado por delante de la secuencia de la misma. Este plásmido, además, contiene todos los elementos de procesamiento viral necesarios para la producción de partículas lentivirales sin capacidad replicativa (Wu et al 2000), así como los elementos para mejorar el título de lentivirus obtenido, la expresión del transgen y las demás funciones del vector como se especifica en la representación esquemática del plásmido en la figura 7.

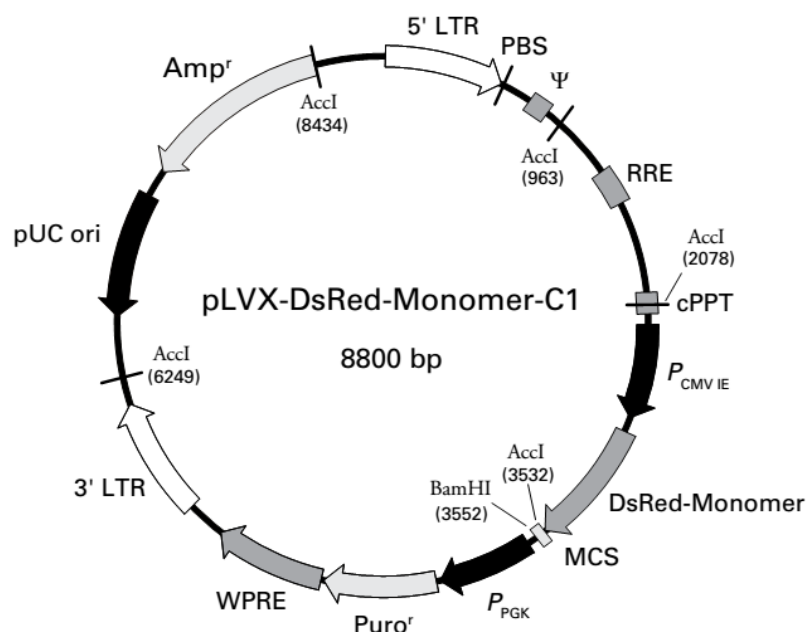


Figura 7. Representación esquemática del plásmido *pLVX-DsRed-Monomer-C1*. PBS: sitio de unión del cebador; DsRed-Monomer: secuencia que codifica para la proteína roja fluorescente de *Discosoma sp.*; MCS: zona de clonación múltiple; pUC: origen de replicación de *Escherichia coli*; cPPT: región central polipurina; WPRE, elemento regulador post-transcripcional *woodchuck*; Amp^r y Puro^r: genes de resistencia a los antibióticos ampicilina y puromicina respectivamente; P_{PGK}: promotor de la fosfoglicerato quinasa; Ψ: señal de empaquetamiento de lentivirus; PRE: elemento de respuesta a Rev, las regiones LTR: repetición terminal larga tanto del extremo 3' como del 5'; P_{CMV IE}: promotor de genes inmediatamente tempranos del citomegalovirus humano (imagen tomada de Clontech).

1.2.1.1.3 PCR del gen RGS14₄₁₄ con extremos cohesivos de restricción

Para la inserción del gen en la zona de clonación múltiple del plásmido pLVX, se eligieron las enzimas de restricción EcoRI y XhoI (New England Biolabs, R0101S y R0146S) como se indica en la figura 8.

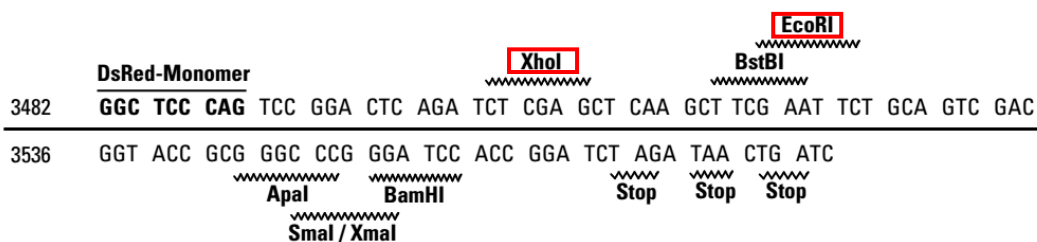


Figura 8. Secuencia de nucleótidos de la cadena sentido de la zona de clonación múltiple del plásmido pLVX. Se destacan las secuencias diana para las distintas enzimas de restricción (imagen tomada de Clontech).

Para confirmar la ausencia de la secuencia diana de corte de estas endonucleasas en el marco abierto de lectura del gen RGS14₄₁₄, se realizó un análisis previo de los sitios de restricción con el programa NEBcutter versión 2.0 (New England Biolabs). Se diseñó un cebador sentido 5'→3', con la secuencia diana de corte para la enzima de restricción XhoI (M103-XhoI en tabla 1) y un cebador anti-sentido 3'→5' con la secuencia de restricción de EcoRI (M104-EcoRI en tabla 1).

Tabla 1 Secuencias de los cebadores empleados en la PCR. Se indican las secuencias diana de corte para las enzimas de restricción XhoI y EcoRI.

CEBADOR	SECUENCIA (5'→3')
M103-XhoI	TACTC*TCGAG GAAGGAGATA GA ACCATGG <u>G</u> ATTTCGGGCACAGCAGCTTCAGATC XhoI
M104-EcoRI	ACACG* AATTCGAG GGC TGA GTC GGT GGT GGA EcoRI

*. Punto de corte de las enzimas. En rojo se marca la secuencia Shine-Dalgarne y en verde la secuencia Kozak. Los dos nucleótidos que aparecen subrayados se añadieron para evitar romper el marco de lectura del gen.

La reacción de PCR y sus fases se describen en la tabla 2 y tabla 3 respectivamente.

Tabla 2. Características de la reacción de PCR.

COMPONENTE	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
5X Colorless Go Taq® Flexi Buffer Mg free (Promega, M890A)	10 µl	1X
MgCl₂ (25 mM) (Promega, A351B)	2 µl	1 mM
PCR Nucleotide Mix (1,25 mM) * (Promega)	5 µl	125 µM (cada nucleótido)
Cebador M103-XhoI, 10µM (Sentido) (Sigma-Aldrich)	2 µl	0,4 µM
Cebador M104-EcoRI, 10µM (Anti-sentido) (Sigma-Aldrich)	2 µl	0,4 µM
cDNA del gen RGS14₄₁₄ (560 ng/µl)	0,5 µl	280 ng
GoTaq® g2 Flexi DNA polymerase (5 U/µl) (Promega, M780A)	0,5 µl	2,5 U
Nuclease-Free Water (Gibco, 10977)	28 µl	n/a
Volumen total	50 µl	

*Para preparar la mezcla (1,25 mM) se usó dATP (Promega, U120B), dGTP (Promega, U121B), dCTP (Promega, U122B) y dTTP (Promega, U123B) con una concentración inicial de 100 mM para cada nucleótido.

Tabla 3. Ciclos y temperaturas de la reacción PCR.

FASE	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min
30 ciclos	Desnaturalización	95 °C
	Alineación	57 °C
	Extensión	72 °C
Etapa final	4 °C	--

1.2.1.1.4 Purificación del producto de PCR

El producto final resultante de la PCR (gen de RGS14₄₁₄ con extremos cohesivos) se separó en función de su tamaño mediante la técnica de electroforesis horizontal en un gel de agarosa (apéndice 1.a.2) sometido a una corriente constante de 100 V y usando el tampón Tris-Bórico-EDTA (TBE) 1X (apéndice 1.a.1) En dicho gel se cargó este producto final y el marcador de peso molecular de 1 Kb (*Plus DNA Ladder*, Life Technologies, 10787). La proporción de muestra y glicerol al 30 % cargada en cada pocillo fue de 4:1 (muestra:glicerol) (figura 9). Tras finalizar la electroforesis, la banda correspondiente al gen se observó e

identificó por su tamaño (1245 bp) en un transiluminador de luz ultravioleta. Una vez identificada, se cortó cuidadosamente con una hoja de bisturí estéril, se depositó en un tubo de 1,5 ml y se pesó (≈ 350 mg).

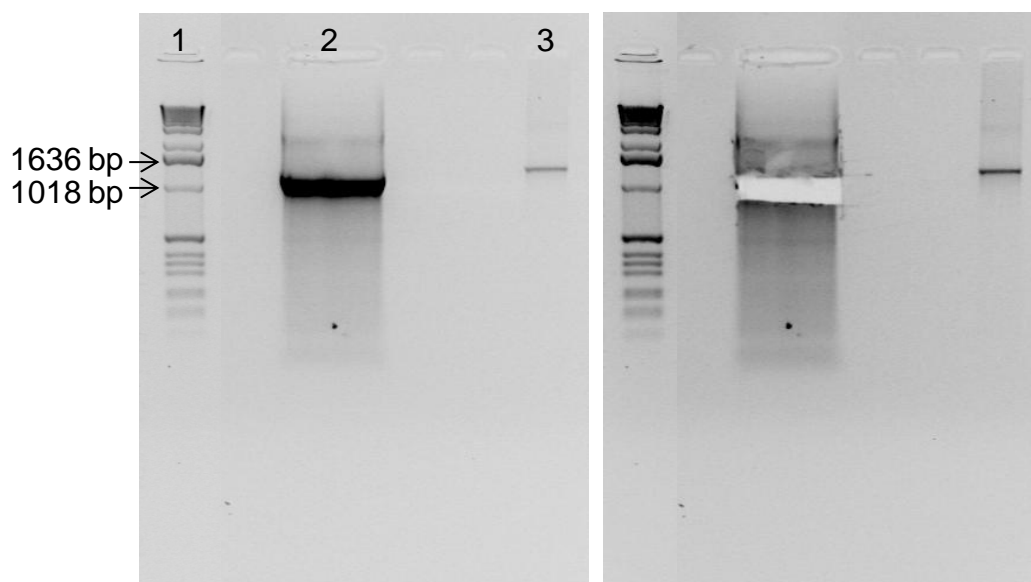


Figura 9. Electroforesis para la purificación en gel del gen. La imagen de la izquierda muestra el gel antes de cortar la banda correspondiente al gen RGS14₄₁₄ (≈ 1.245 bp) y la imagen de la derecha muestra el gel tras cortar dicha banda. Calle 1: marcador de peso molecular de 1 Kb; calle 2: gen RGS14₄₁₄ con extremos cohesivos y calle 3: cDNA del gen RGS14₄₁₄ original (control positivo).

A continuación se procedió a la purificación del DNA empleando el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, A9281), de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante (apéndice 1.c.2). La concentración del gen RGS14₄₁₄ con los extremos cohesivos fue 55,63 ng/ μ l.

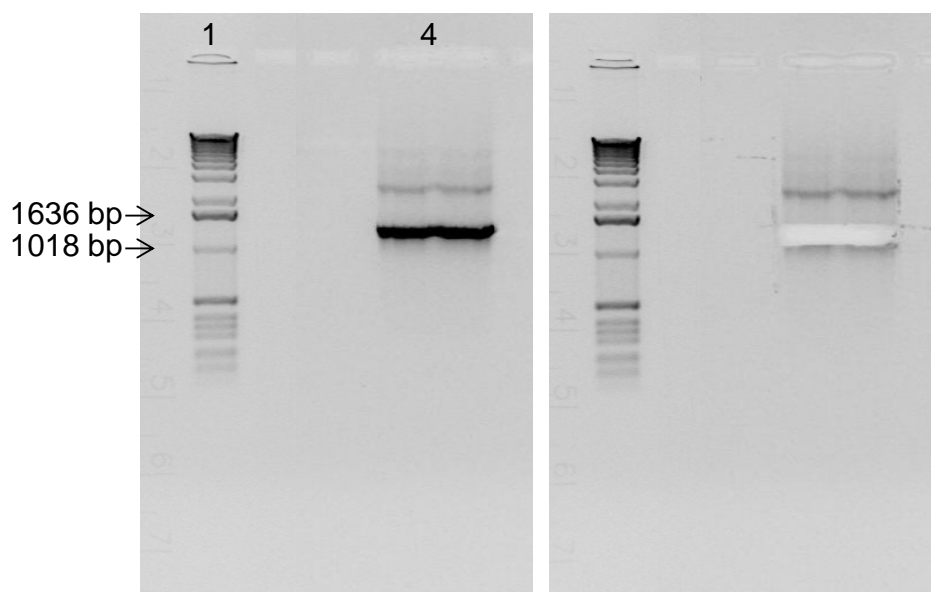
1.2.1.1.5 Reacción de restricción

Con el fin de exponer los extremos cohesivos del gen RGS14₄₁₄ se realizaron reacciones de restricción a partir del DNA purificado y el plásmido pLVX, utilizando las dos enzimas de restricción EcoRI y XhoI (tabla 4).

Tabla 4. Reacción de restricción del gen RGS14₄₁₄ y el plásmido pLVX.

COMPONENTE	VOLUMEN	
	GEN RGS14 ₄₁₄ (55,63 ng/μl)	PLÁSMIDO pLVX (0,5 μg/μl)
cDNA	18 μl (1 μg)	1 μl (0,5 μg)
XhoI (20000 U/ml)	1,5 μl (30 U/μg DNA)	0,25 μl (10 U/μg DNA)
EcoRI (20000 U/ml)	1,5 μl (30 U/μg DNA)	0,25 μl (10 U/μg DNA)
NEBuffer 2.1(10X) (New England Biolabs, B7202S)	5 μl	2,5 μl
Nuclease-Free Water (Gibco,10977)	24 μl	25 μl
Volumen total	50 μl	25 μl

La reacción se incubó a 37 °C en un baño termostático durante 4 h en el caso del plásmido pLVX y 16 h en el caso del gen RGS14₄₁₄, puesto que el plásmido presenta mayor grado de pureza que el inserto. A continuación, las enzimas de restricción se inactivaron por calor sometiendo la muestra a 65 °C durante 20 min en un baño seco. Una vez finalizadas las reacciones de restricción, ambos productos se purificaron en gel tal y como se explicó anteriormente (apartado III.1.2.1.1.4). Por último se estimó la concentración tanto del cDNA del gen RGS14₄₁₄ como del plásmido pLVX, siendo de 6,06 ng/μl para ambos (figura 10).

A. Gen RGS14₄₁₄

B. Plásmido pLVX

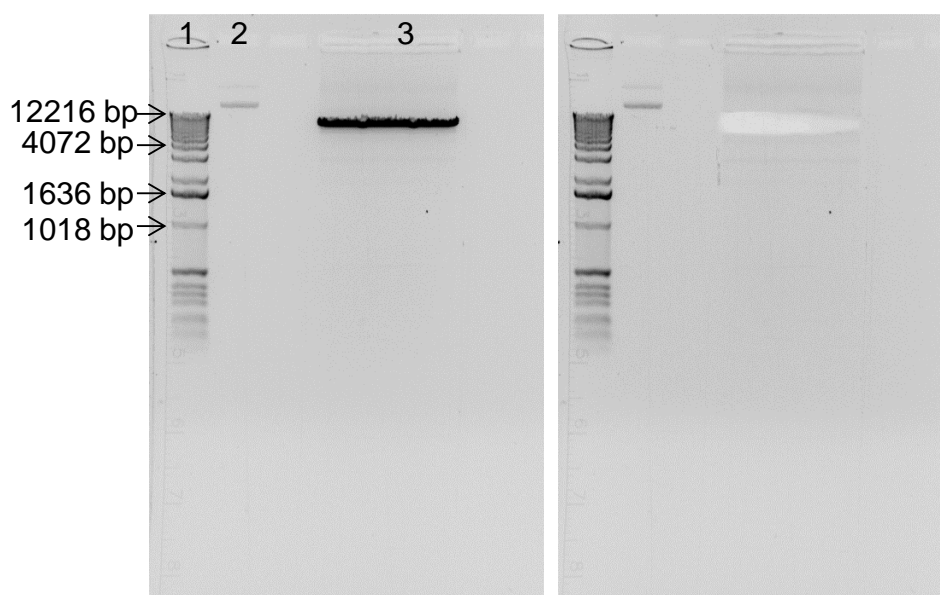


Figura 10. Electroforesis para la purificación en gel del producto resultante de las reacciones de restricción. (A) La imagen de la izquierda muestra el gel antes de cortar la banda correspondiente al gen RGS14₄₁₄ (\approx 1245 bp) (Calle 4) y la imagen de la derecha muestra el gel tras cortar dicha banda. (B) La imagen de la izquierda muestra el gel antes de cortar la banda correspondiente al plásmido pLVX (\approx 8800 bp) (Calle 3) y la imagen de la derecha muestra el gel tras cortar dicha banda. Calle 1: marcador de peso molecular de 1Kb; calle 2: vector pLVX original (control positivo).

1.2.1.1.6 Ligación del gen RGS14₄₁₄ en el plásmido

Se llevó a cabo una reacción de ligación para insertar el DNA del gen RGS14₄₁₄ en el plásmido pLVX con una proporción 3:1, empleando la enzima T4-Ligasa como se detalla en la tabla 5.

Tabla 5. Reacción de ligación del gen RGS14₄₁₄ en el plásmido pLVX.

COMPONENTE	VOLUMEN
5X reaction buffer (Life technologies, 46300-18)	4 µl
cDNA del gen RGS14₄₁₄ (6,06 ng/µl)	9,9 µl (60 ng)
cDNA del plásmido pLVX (6,06 ng/µl)	3,3 µl (20 ng)
T4-Ligasa (1 U/µl) (Life technologies, 15224)	1 µl
Nuclease-Free Water	1,8 µl
Volumen total	20 µl

Con el fin de romper las posibles uniones inespecíficas entre ambos extremos cohesivos del gen, se incubó la mezcla de componentes (salvo la enzima T4-Ligasa) a 45 °C durante 5 min en un baño seco. Tras dicha incubación, se colocó la mezcla en hielo y se añadió la enzima T4-Ligasa, incubándose durante 1 h a 24 °C en un baño termostático. Por último, se inactivó la enzima sometiendo la muestra a 70 °C durante 10 min en un baño seco.

1.2.1.1.7 Transformación en *E. coli*

Las bacterias competentes utilizadas fueron *One Shot® Omni Max™ 2 T1® Chemically Competent E.coli* (Life Technologies, C8540-03) las cuales fueron transformadas por choque térmico con el vector recombinante del gen RGS14₄₁₄ generado durante el proceso de ligación de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante (apéndice 1.b.2). Finalmente, en las placas sembradas de la reacción de transformación, se visualizaron varias colonias de las cuales se testaron 4 (Col. 1-4).

1.2.1.1.8 Extracción y purificación del vector recombinante

Para evaluar la correcta inserción del gen, las 4 colonias (Col. 1-4) se inocularon individualmente en 2 ml de medio líquido LB suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml (apéndice 1.b.1) en tubos de 15 ml (Falcon, 352059). Éstos se incubaron a 37 °C en agitación a 225 rpm durante 16 h en un incubador-agitador de cultivos. Con el fin de mantener las 4 colonias durante su evaluación, se sembraron en placas de LB-Agar con ampicilina a 100 µg/ml.

1.2.1.1.8.1 Miniprep del DNA para la evaluación del inserto

Para la extracción y purificación del vector recombinante del gen RGS14₄₁₄ se empleó el *StrataPrep plasmid miniprep kit* (Agilent technologies, 400761) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante (apéndice 1.c.3). El volumen final de DNA purificado para cada colonia fue de 28 μ l, verificándose la correcta inserción del gen a través de la realización de reacciones de restricción de prueba (tabla 6).

Tabla 6. Reacción de restricción de prueba para el producto de la *Miniprep*.

COMPONENTE	VOLUMEN (Para cada colonia)
DNA purificado (<i>Miniprep</i>)	5 μ l
XhoI (20000 U/ml)	1,5 μ l (30 U/ μ g DNA)
EcoRI (20000 U/ml)	1,5 μ l (30 U/ μ g DNA)
NEBuffer 2.1(10X) (New England Biolabs, B7202S)	2 μ l
Nuclease-Free Water	10 μ l
Volumen total	20 μl

Las reacciones de restricción se incubaron a 37 °C en un baño termostático durante 16 h. Transcurrido este periodo de tiempo, se volvió a añadir a cada reacción 15 U de enzima volviéndose a incubar durante 2 h a 37 °C. A continuación, las enzimas de restricción se inactivaron por calor sometiendo las muestras a 65 °C durante 20 min en un baño seco. Los productos resultantes de las reacciones de restricción de cada colonia (Col. 1-4) se analizaron en un gel de agarosa al 1 %. Como muestra la figura 11, las colonias 2 y 3 contienen el inserto del gen.

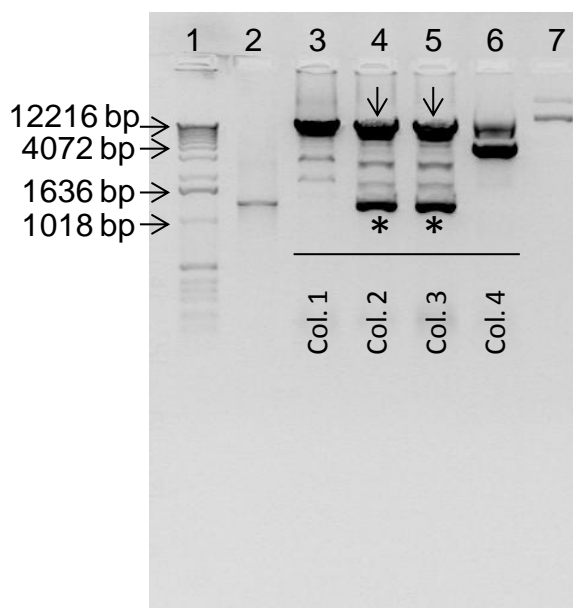


Figura 11. Electroforesis del resultado de las reacciones de restricción de prueba de las 4 colonias (Col.1-4) obtenidas a partir de la transformación en células competentes. Las colonias 2 (calle 4) y 3 (calle 5) se transformaron correctamente con el vector recombinante del gen RGS14₄₁₄ ya que presentan tanto la banda del plásmido pLVX (8,8 Kb) indicada con una flecha como la banda del gen RGS14₄₁₄ (1,28 Kb) indicada con un asterisco. Las colonias 1 (Calle 3) y 4 (calle 6) no se transformaron, como indica únicamente la presencia de la banda del plásmido pLVX. Calle 1: marcador de peso molecular de 1Kb; calle 2: cDNA del gen RGS14₄₁₄ original; Calle 7: plásmido pLVX original (controles positivos).

1.2.1.1.8.2 Maxiprep

Se eligió la colonia 2 para llevar a cabo la *maxiprep* y así preparar una mayor cantidad del vector recombinante del gen RGS14₄₁₄. A partir del stock bacteriano mantenido en la placa LB-Agar de la colonia 2 se sembró por inoculación una muestra en 5 ml de medio de cultivo LB líquido con 100 µg/ml de ampicilina (apéndice 1.b.1) en un tubo de 15 ml. Dicho tubo se incubó en un incubador-agitador de cultivos a 37 °C y 225 rpm con una inclinación de 45° durante 8 h. Estos 5 ml de cultivo bacteriano se vertieron en un matraz con 300 ml del mismo medio de cultivo LB que se incubó durante 15 h en las mismas condiciones de temperatura y agitación comentadas.

La reacción de *maxiprep*, se realizó empleando el kit *Wizard® Plus Maxiprep DNA Purification System* (Promega, A7270) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante (apéndice 1.c.4). Al final de la purificación se obtuvo 1 ml de solución de DNA con una concentración de 635 ng/µl. La inserción del gen se verificó a partir de la realización de la reacción de restricción de prueba indicada en la tabla 7. Además, la verificación de la secuencia se llevó a cabo mediante secuenciación en la unidad de genómica del servicio de secuenciación del parque científico de Madrid. En la comparación de la misma con la original no se detectó ninguna mutación en el inserto.

Tabla 7. Reacción de restricción de prueba para el producto de la *Maxiprep*.

COMPONENTE	VOLUMEN
DNA purificado (<i>Maxiprep</i>)	0,8 µl (500 ng)
XhoI (20000 U/ml)	0,75 µl (30 U/µg DNA)
EcoRI (20000 U/ml)	0,75 µl (30 U/µg DNA)
NEBuffer 2.1(10X)	2 µl
Nuclease-Free Water	15,7 µl
Volumen total	20 µl

Esta reacción de restricción se incubó a 37 °C en un baño termostático durante 4 h. A continuación, las enzimas de restricción se inactivaron por calor sometiendo la muestra a 65 °C durante 20 min en un baño seco. Finalmente, el producto de la reacción de restricción se cargó en un gel de agarosa al 1 % (figura 12).

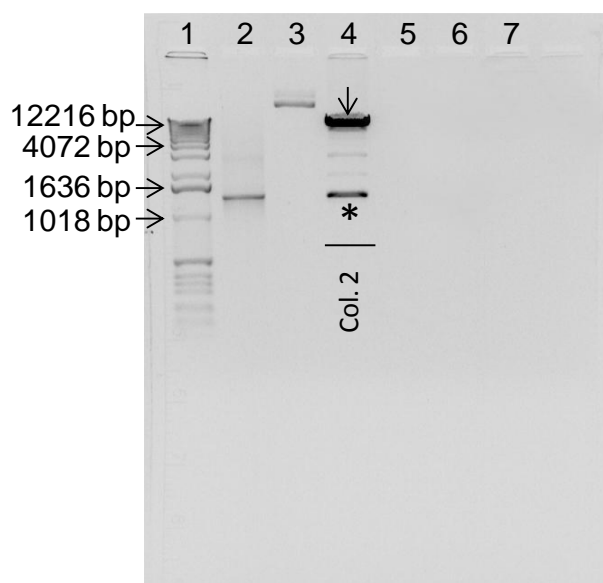


Figura 12. Electroforesis del resultado de la reacción de restricción de prueba de la colonia 2 (Col.2) obtenida a partir de la transformación en células competentes. Se confirma que la colonia 2 (calle 4) se transformó correctamente con el vector recombinante del gen RGS14₄₁₄ ya que presenta tanto la banda del plásmido pLVX (8,8 Kb) indicada con una flecha como la banda del gen RGS14₄₁₄ (1,28 Kb) indicada con un asterisco. Calle 1: marcador de peso molecular de 1Kb; calle 2: cDNA del gen RGS14₄₁₄ original; Calle 3: plásmido pLVX original (controles positivos).

1.2.1.2 Obtención y titulación de lentivirus

1.2.1.2.1 Líneas celulares utilizadas durante el proceso

(i) La producción de lentipartículas se llevó a cabo en la línea celular 293T (Clontech, 632180), derivada de células humanas embrionarias de riñón (HEK) (Pear et al 1993), transformadas con el DNA del adenovirus humano tipo 5 y que expresa el antígeno

grande del Virus del Simio 40 (SV40) bajo el control del promotor constitutivo de alto nivel del *citomegalovirus* humano (CMV). La tabla 8 indica la composición del medio de cultivo para esta línea celular.

Tabla 8. Medio de cultivo para la línea celular 293T.

COMPONENTE		VOLUMEN
Medio base		450 ml
Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco, 52100-021)	6,69 g	
Bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, S5761)	1,85 g	
Solución de aminoácidos no esenciales 100X (Gibco, 11140-050)	5 ml	
L-Glutamina 200mM (Gibco, 25030-032)	5 ml	
Piruvato de sodio a 100mM (Gibco, 11360-070)	5 ml	
Agua Milli-Q	485 ml	
Total	500 ml	
Suero fetal bovino (Tet System Approved) (Clontech, 631105)		50 ml
Penicilina-streptomicina (Gibco, 15140-122)		5 ml

*En el apéndice 2 se desglosan los protocolos de congelación-descongelación de las células, así como de realización de un subcultivo. Estas células requieren un pretratamiento específico de la superficie de cultivo (apéndice 2.a).

(ii) La titulación de lentivirus se realizó sobre la línea celular HT1080 (ATCC, CCL-121) derivada de tejido conectivo de fibrosarcoma humano. La tabla 9 indica la composición del medio de cultivo para esta línea celular.

Tabla 9. Medio de cultivo para la línea celular HT1080.

COMPONENTE		VOLUMEN
Medio base		450 ml
Medio mínimo esencial (MEM) (Gibco, 41500-018)	4,81 g	
Bicarbonato de sodio	0,75 g	
Piruvato de sodio a 100mM (Gibco, 11360-070)	5 ml	
Agua Milli-Q	495 ml	
Total	500 ml	
Suero fetal bovino (Gibco, 10500-064)		50 ml
penicilina-streptomicina		5 ml

*En el apéndice 2 se desglosan los protocolos de congelación-descongelación de las células, así como de realización de un subcultivo.

1.2.1.2.2 Transfección, producción y concentración de lentivirus

1.2.1.2.2.1 Transfección y producción

El proceso de producción de lentivirus se realizó a partir de la transfección de las células 293T con el vector recombinante del gen RGS14₄₁₄. Se utilizó el kit *Lenti-XTM Packaging System* (Clontech, 631247) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (apéndice 2.d) y cumpliendo con las condiciones del nivel 2 de bioseguridad recomendadas (Chosewood et al 2009).

Esta transfección se llevó a cabo en el subcultivo o pase 7 de la línea celular realizado sobre placas de cultivo de 100 mm (Corning, 734-1815). Se sembraron 6 placas a una concentración de $4,5 \times 10^6$ células por placa en medio de cultivo sin antibióticos. Tras 72 h, se recogió el sobrenadante que contiene lentivirus en tubos *Ultra-Clear* (Beckman Coulter, 344058) para su posterior concentración.

1.2.1.2.2.2 Concentración de lentivirus

Se realizó mediante la ultracentrifugación (Ichim & Wells 2011; Reiser 2000) del sobrenadante (30 ml por tubo) a 25000 rpm durante 1 h 30 min a 4 °C, usando la ultracentrífuga Beckman XL-90 y el rotor SW29. Una vez acabada la centrifugación, se descartó el sobrenadante cuidadosamente por decantación y se eliminó la última gota del mismo con la ayuda de una pipeta P1000. Se resuspendió el pellet de cada tubo en 150 µl de suero salino estéril y se conservó a 4 °C toda la noche. Finalmente se realizaron alícuotas de 3 µl que se almacenaron a -80 °C.

Para la obtención de un *stock* de lentivirus-vehículo, se siguió el mismo procedimiento de transfección, producción y concentración utilizando el vector pLVX vacío (sin inserto).

1.2.1.2.3 Titulación de lentivirus

Se llevó a cabo en las células HT1080. La infección con lentivirus en esta línea celular se realizó a partir del subcultivo 4, en placas de 6 pocillos (Nunc, 140675) a una densidad celular de 2×10^5 células por pocillo en 2 ml de medio completo. A las 24 h desde la siembra, se retiró el medio de cultivo y se añadieron distintas diluciones seriadas de lentivirus previamente preparadas: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} dejado un pocillo control “Mock” carente de lentivirus. Estas diluciones seriadas se prepararon a partir de una de las alícuotas de

lentivirus de 3 μ l a la que se le añadieron 27 μ l de medio completo para HT1080 (Dilución 1:10, “ 10^{-1} ”). Tras 48 h, se reemplazó el medio por medio completo. Para llevar a cabo la selección de las células infectadas basada en la resistencia del plásmido hacia el antibiótico puromicina se reemplazó el medio de la placa cada 48 h durante 10-12 días por medio completo con puromicina (Clontech, 631306) a una concentración de 1 μ g/ml.

Después de la selección, se procedió a calcular el título vírico obtenido mediante recuento de colonias en los pocillos infectados con distintas concentraciones de lentivirus, utilizando para ello la tinción con cristal violeta (apéndice 2.e). Se calculó la media entre el recuento de colonias crecidas en las distintas diluciones donde el número de colonias es inferior a 300 multiplicado por el factor de dilución. En este caso se obtuvo un título de **$1,75 \times 10^7$ CFU / ml** para los lentivirus-RGS14₄₁₄ y de **$2,75 \times 10^6$ CFU / ml** para los lentivirus-vehículo (figura 13).

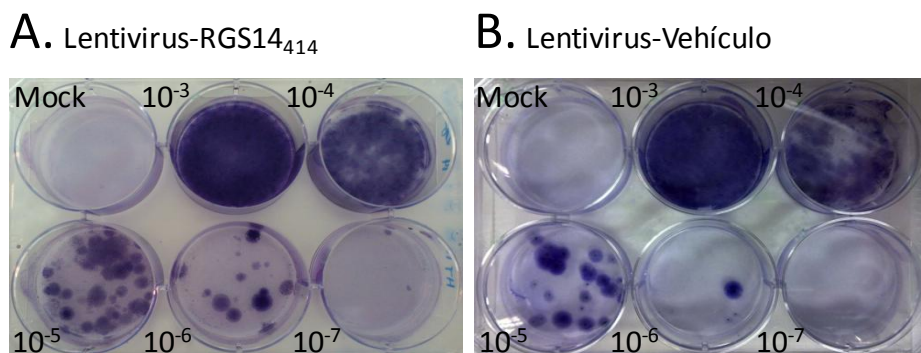


Figura 13. Titulación de los lentivirus-RGS14₄₁₄ (A) y lentivirus-Vehículo (B)

1.2.2 Condiciones de estabulación y cirugía estereotáxica

1.2.2.1 Condiciones de estabulación

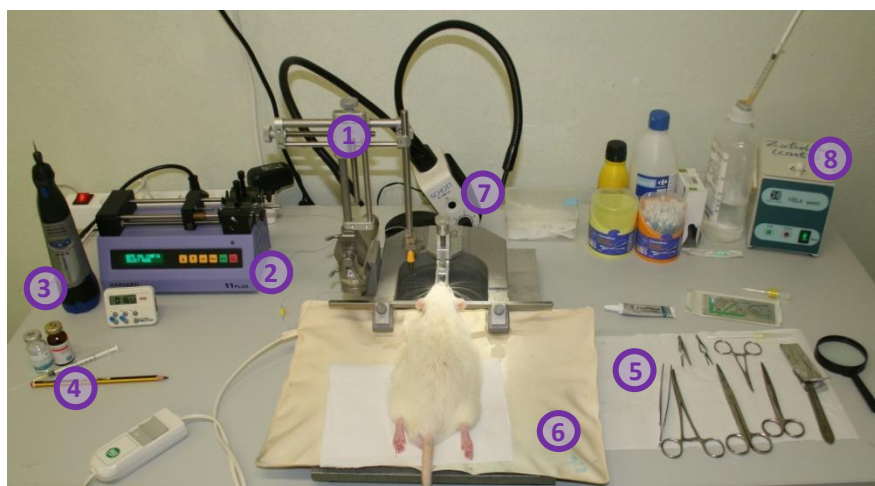
Los animales se mantuvieron estabulados en condiciones ambientales controladas en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga. La temperatura media de la habitación fue de 20 ± 2 °C y el fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad. Los animales tenían libre acceso al pienso y al agua y los estudios siempre se desarrollaron durante el periodo de luz.

El cuidado y tratamiento de los animales se realizó en todo momento de acuerdo con las directivas Europea (2010/63/2013) y Nacional (Real Decreto 53/2013) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y con la aprobación del Comité Ético de la Universidad de Málaga.

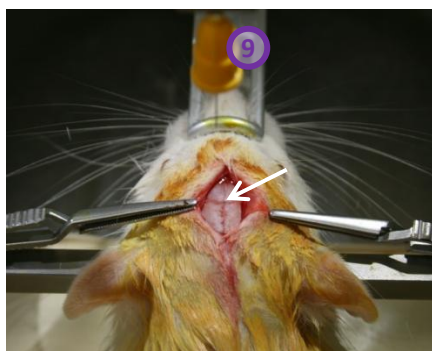
1.2.2.2 Cirugía estereotáxica

1.2.2.2.1 Procedimiento quirúrgico

A



B



C

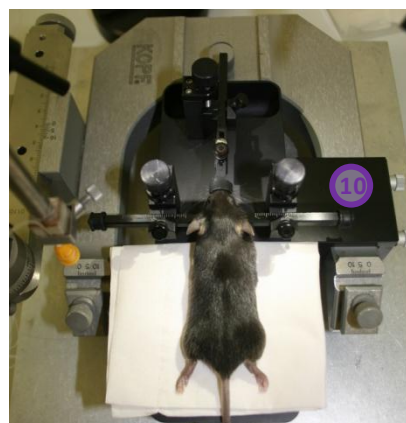


Figura 14. Ilustración del procedimiento experimental para la realización de microinyecciones intracraneales de lentivirus en roedores. (A). Fotografía que muestra una ratona colocada en el estereotáxico. **(B).** Fotografía que muestra la posición del bregma (indicado con una flecha) en el cráneo de la ratona. **(C).** Fotografía que muestra un ratón colocado en el estereotáxico. **1:** estereotáxico; **2:** sistema de infusión; **3:** taladro; **4:** anestésicos; **5:** instrumentos quirúrgicos; **6:** manta eléctrica; **7:** luz fría; **8:** esterilizador por calor seco; **9:** cúpula dental; **10:** adaptador estereotáxico para ratón.

Previo al procedimiento quirúrgico, los animales fueron anestesiados con la administración por vía intraperitoneal de 75 mg/kg de ketamina (Imalgene 1000, Merial Laboratorios) y medetomidina (Domtor, Pfizer) a la dosis de 1 mg/kg (en el caso de las ratas) ó 0,5 mg/kg (en el caso de los ratones). Una vez anestesiados se colocaron sobre un aparato estereotáxico de rata (Stoelting) en el caso de esta especie, y sobre un adaptador estereotáxico para ratón (Cunningham mouseTM, Harvard Apparatus) previamente acoplado al estereotáxico de rata en el caso de los ratones. (Cetin et al 2006). La infusión de lentivirus se realizó

mediante una cápsula dental de 30 G (Heraeus Kulzer Iberia) conectada a una jeringa Hamilton de 10 ml (Microliter™ #701, Harvard Apparatus) a través de un sistema de tubos de plástico y acoplada a su vez a una bomba de infusión (11 Plus, Harvard Apparatus) (figura 14). El flujo de infusión fue de 10 µl/h y se llevaron a cabo inyecciones unilaterales de 2 µl (para rata) ó 1 µl (para ratón) de lentivirus-RGS14₄₁₄ o lentivirus-vehículo en el hemisferio derecho.

1.2.2.2.2 Coordenadas de inyección

Las coordenadas de inyección en ratón se obtuvieron a partir del atlas de encéfalo de ratón “*The Mouse Brain in Steriotaxic Coordinates*” (Paxinos & Franklin 2001) y las de rata a partir del atlas de encéfalo de rata “*The Rat Brain in Steriotaxic Coordinates*” (Paxinos & Watson 1998) (tabla 10).

Tabla 10. Coordenadas de inyección para rata y ratón en el área V2.

ESPECIE	COORDENADAS		
	Anteroposterior (AP)*	Mediolateral (ML)*	Dorsoventral (DV)**
RATÓN	-2,3	± 1,3	-0,7
RATA	-4,3	± 2,1	-1,9

* (AP) y (ML) obtenidas desde el bregma
 ** (DV) medida desde duramadre

1.2.2.2.3 Recuperación post quirúrgica

Durante los cinco días posteriores a la cirugía y con el fin de asegurar la total recuperación de los animales, estos recibieron el siguiente tratamiento:

(i) tratamiento tópico posquirúrgico sobre la zona de incisión o alrededor de la cánula implantada con el preparado Dermocan (Fatro), indicado en la profilaxis de las infecciones bacterianas y cuando la acción antiinflamatoria y/o analgésica sea necesaria, caso que nos ocupa. Su composición incluye antibióticos de amplio espectro (bacitracina y neomicina), el glucocorticoide hidrocortisona, el anestésico local lidocaína y vitamina A;

(ii) tratamiento subcutáneo con 150 µl del analgésico-antiinflamatorio meloxicam (Metacam 5 mg/ml, boehringer Ingelheim);

(iii) tratamiento oral con 300 μ l del analgésico-opioáceo buprenorfina (Buprex 0,3 mg/ml, RB Pharmaceuticals) en 300 ml de agua de bebida.

Una vez recuperados los animales y tras 21 días desde la inyección con lentivirus-RGS14₄₁₄ o lentivirus-vehículo, momento en el que se observa el efecto potenciador de la memoria producido por el tratamiento (Lopez-Aranda et al 2009), se procedió a realizar los experimentos comportamentales en estos animales.

1.2.3 Comprobación de la expresión de RGS14₄₁₄ mediante inmunofluorescencia

Para comprobar la expresión de la proteína RGS14₄₁₄ en el área del cerebro a estudio, se llevó a cabo un marcaje fluorescente de la proteína (figura 15) como se describe en el apéndice 4.

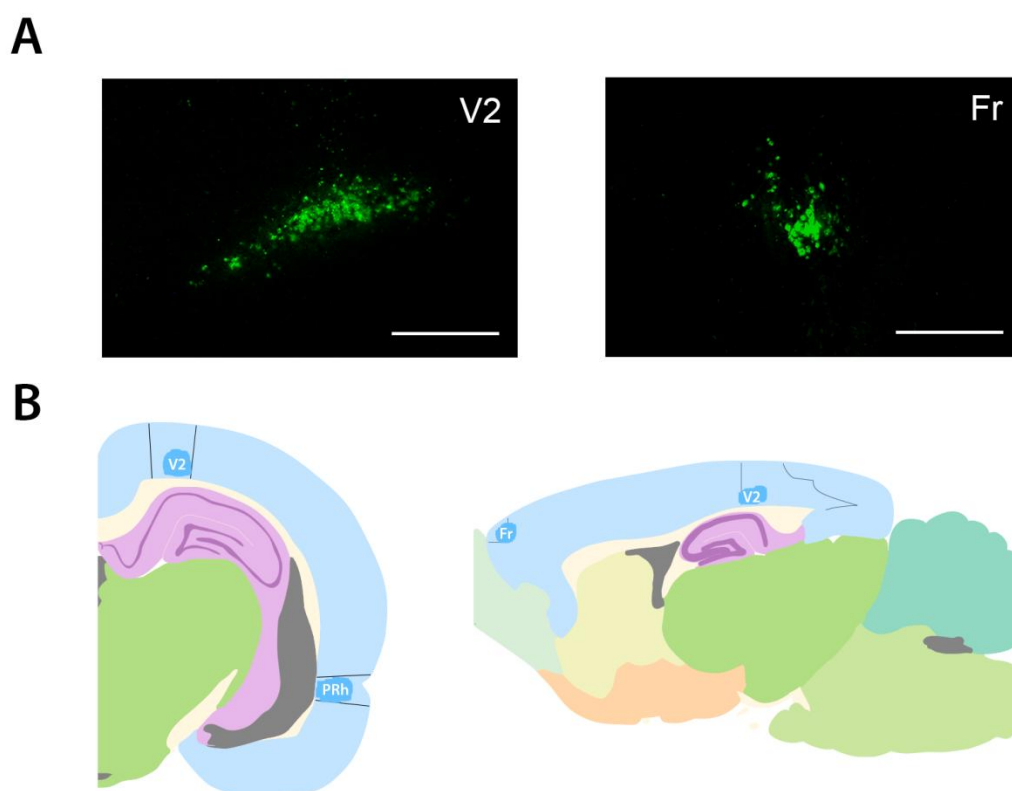


Figura 15. Confirmación de la expresión de la proteína RGS14 en ratas tratadas con RGS14. (A). Imagen representativa que ilustra la expresión de RGS14 mediante inmunofluorescencia en secciones coronales de cerebro del área V2 (V2) y la corteza frontal (Fr). Las barras representan 200 μ m. **(B).** Dibujos esquemáticos representativos de una sección coronal (izquierda) y una sección sagital (derecha) indicando la localización de la proteína RGS14 (azul) en los sitios de inyección. Las áreas V2, Fr y perirrhinal (PRh) están delimitadas mediante líneas finas.

1.2.4 Test de ORM

El test de ORM se utilizó como herramienta para la estimación de la memoria de reconocimiento de objetos de los animales de experimentación. Prueba basada en la tendencia espontánea de los animales por explorar preferentemente un objeto nuevo, en lugar de uno familiar que ha sido presentado previamente. (Ennaceur & Delacour 1988). Este test se desarrolló de día y dependiendo tanto de señales visuales como táctiles incluídas las vibrisas.

1.2.4.1 Test de ORM en rata

El protocolo empleado fue el descrito anteriormente por nuestro equipo (Lopez-Aranda et al 2009), que consta de tres fases:

(i) La fase de manipulación (*Handling*) fue 8 min al día 5 días consecutivos colocando al animal en el brazo del investigador. Cada 2-3 min se cogió la rata por el cuerpo y se realizó un moviendo suave de subida y bajada (para simular la colocación del animal en la caja experimental durante las siguientes fases).

(ii) La fase de habituación fue de 12 min al día, 3 días consecutivos en campo abierto (*open field*) de color negro con unas dimensiones de 100 x 100 x 50 cm. Estas sesiones de habituación se realizaron con el fin de familiarizar al animal tanto a la habitación como a la caja experimental donde se lleva a cabo la posterior fase de prueba.

(iii) La fase de prueba que consta a su vez de dos pasos (figura 16):

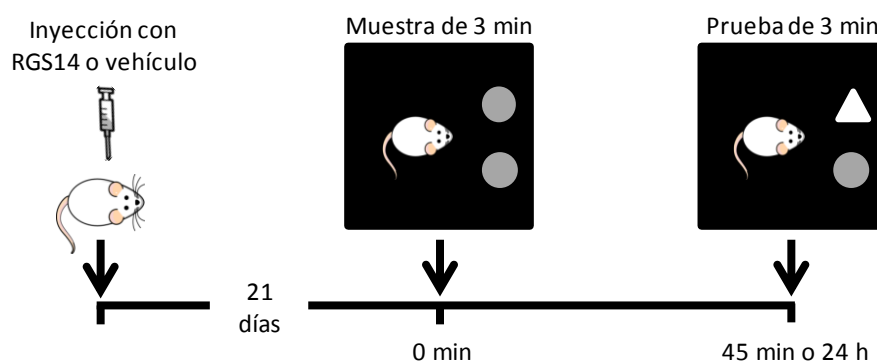


Figura 16. Esquema del test de memoria de reconocimiento de objetos en rata.

a) Muestra de objetos (o adquisición): Se colocaron dos objetos idénticos separados entre sí y de la pared posterior de la caja 30 cm. La rata se situó mirando hacia la pared opuesta. Se dejó explorar al animal libremente los dos objetos durante 3 min.

b) Test de discriminación: Tras un tiempo de demora de 45 min ó 24 h desde la adquisición, se expuso la rata a dos objetos; un objeto familiar previamente empleado en la fase de adquisición y un nuevo objeto desconocido para el animal. Se dejó explorar al animal libremente los dos objetos durante 3 min.

1.2.4.2 Test de ORM en ratón

El protocolo empleado para esta cepa, desarrollado previamente por otros grupos de investigación (Escribano et al 2009; Schiapparelli et al 2006), consta de tres fases:

(i) La fase de manipulación (*Handling*) fue similar a la descrita anteriormente para rata excepto la colocación del animal que en este caso fue en la palma de la mano del investigador en vez de en el brazo.

(ii) La fase de habituación fue de 10 min al día, 2 días consecutivos en campo abierto de color gris claro con unas dimensiones de 50 x 35 x 50 cm.

(iii) La fase de prueba que consta a su vez de dos pasos se describe a continuación (figura 17):

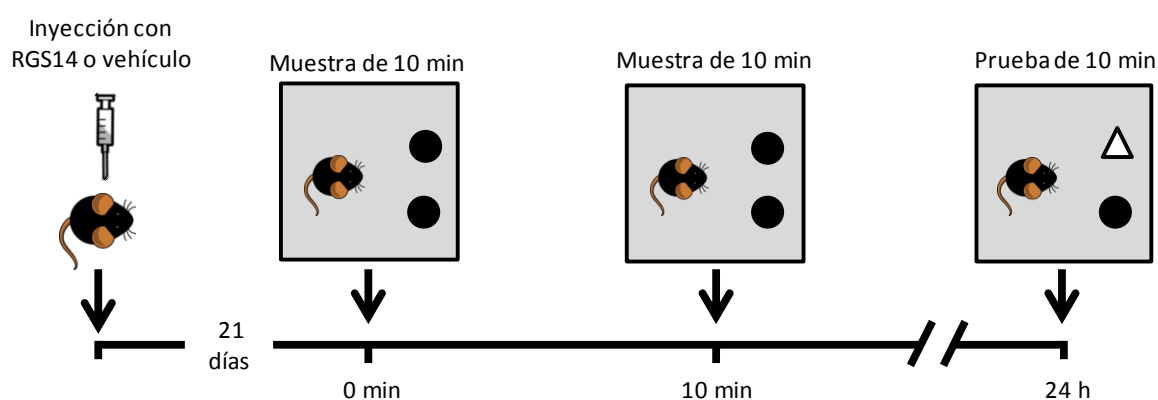


Figura 17. Esquema del test de memoria de reconocimiento de objetos en ratón.

- a) Muestra de objetos (o adquisición): consta a su vez de dos sesiones con un intervalo entre sesión de 10 min. En cada sesión se colocaron dos objetos idénticos en el centro de la caja separados entre sí y de los laterales de la caja 10 cm. El ratón se ubicó mirando hacia la pared opuesta y se dejó explorar al animal libremente los dos objetos durante 10 min.
- b) Test de discriminación: Tras un tiempo de demora de 24 h desde la realización de la segunda fase de muestra, se expuso el ratón a dos objetos; un objeto familiar ya empleado en la fase de muestra y un objeto nuevo desconocido para el ratón. Se dejó explorar al ratón libremente ambos objetos durante 10 min.

Las diferentes parejas de objetos utilizados tanto para rata como para ratón, se detallan en el apéndice 3. (a y b). Estos objetos fueron previamente testados en animales sin tratamiento para demostrar que no existía preferencia por ninguno de ellos, es decir, que los animales exploraron por igual tanto el objeto familiar como el objeto nuevo. Además, para evitar preferencia de lugar, se alternó la posición de los objetos (izquierda / derecha). Con el fin de eliminar posibles señales olfativas, se limpiaron cuidadosamente, antes y después de cada prueba, tanto los objetos como la caja experimental (paredes y base) empleando para ello una solución de agua destilada y alcohol al 70% (Antunes & Biala 2012).

1.2.4.3 Obtención de datos

El tiempo de exploración de cada objeto se cronometró *in situ* y se definió como el tiempo que el animal mantenía el hocico en contacto con el objeto. Además, para confirmar estas mediciones, se grabó la conducta de los animales en vídeo durante la fase de prueba, para volver a cronometrar los tiempos de exploración de cada objeto por parte de otros dos investigadores y evitar así posibles sesgos.

Los tiempos de exploración de los objetos familiar y nuevo por parte de los animales durante el test de ORM se utilizaron para calcular el índice de discriminación (DI). Este índice se define como tiempo empleado por el animal en explorar el objeto nuevo dividido entre el tiempo de exploración total (objeto nuevo + objeto familiar). De esta forma, un $DI \leq 0,5$ indicaría que el animal no recuerda el objeto de la fase de muestra, mientras que un $DI > 0,5$ implicaría una mayor exploración del objeto nuevo. Con un $DI \geq 0,66$ se consideró que el animal recuerda el objeto familiar.

1.2.4.4 Análisis estadístico

Los valores de DI se expresaron como media \pm SEM y el posterior análisis de significancia se calculó mediante pruebas t de *Student* desapareadas (comparación de dos grupos) o *un* ANOVA de un factor (comparación de 3 o más grupos) seguida de las comparaciones post hoc de *Tukey* (comparaciones en parejas) o *Bonferroni* (comparaciones de cada grupo con respecto a un grupo-control), usando el paquete estadístico SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific) y aceptándose un nivel de confianza del 95 % y una probabilidad de error del 5 % ($p \leq 0,05$).

2 Segundo bloque experimental: Identificar las vías implicadas en la potenciación de la memoria mediada por RGS14₄₁₄

2.1 Diseño experimental

En este bloque se plantea estudiar el mecanismo de acción del efecto de RGS14₄₁₄ en el aumento de la memoria episódica, utilizando el test de ORM con un tiempo de demora de 24 h (apartado III.1.2.4). Para desarrollar este bloque experimental, en una primera fase se confirmó el efecto de RGS14₄₁₄ sobre la memoria para luego estudiar el mecanismo de acción de dicho efecto a través de la administración de diferentes fármacos (antagonistas o inhibidores) relacionados con el procesamiento de la memoria en animales tratados con RGS14₄₁₄ (figura 18).

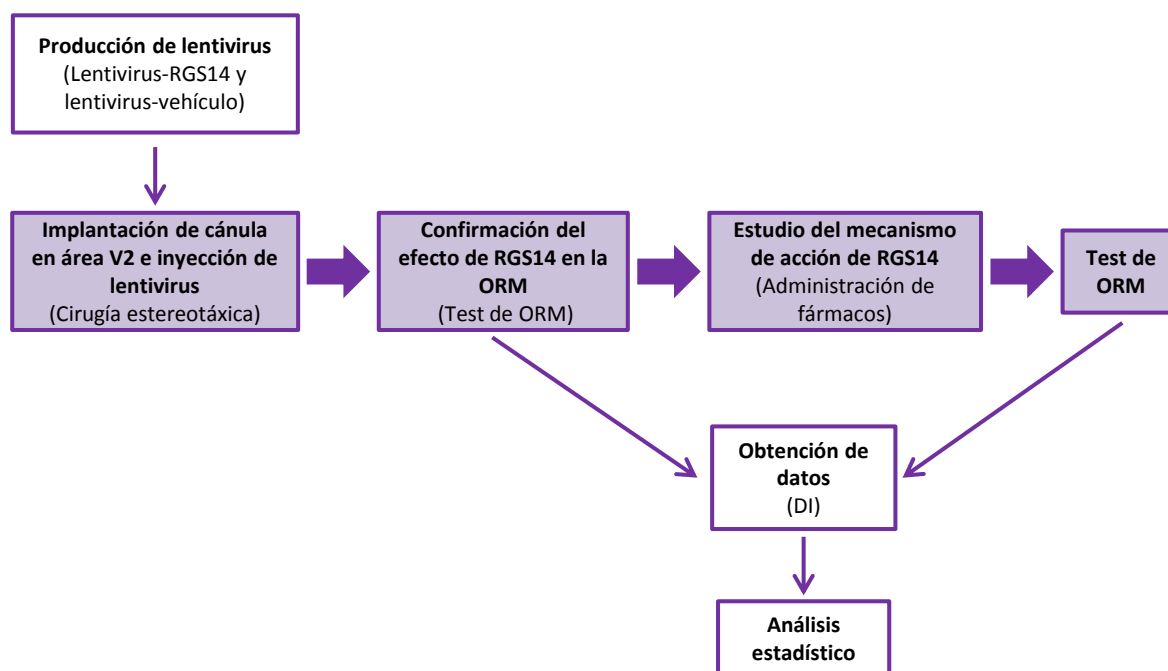


Figura 18. Esquema del diseño experimental.

En la primera fase se emplearon 2 grupos de 7 ratas macho Wistar Han cada uno con 3-4 meses de edad: un grupo-RGS14 tratado con lentivirus-RGS14₄₁₄ y un grupo-vehículo tratado con lentivirus-vehículo (apartados III.1.2.1 y III.1.2.2.2), ambos en el área V2 de la corteza visual. En la segunda fase, para la administración de fármacos, se utilizaron en total 39 animales. En estos animales, se implantó una cánula en el área V2 de la corteza visual (apartado III.2.2.1), para realizar primero la inyección de lentivirus y más tarde la administración de los diferentes fármacos. En la tabla 11 se detallan los antagonistas e inhibidores empleados, sus mecanismos de acción, el momento de administración y el volumen administrado.

Tabla 11. Antagonistas e inhibidores empleados en los estudios farmacológicos.

FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	MOMENTO DE ADMINISTRACIÓN (con referencia al test de ORM)	VOLUMEN ADMINISTRADO	REFERENCIA
CNQX (Ascent, Asc-044)	Potente antagonista competitivo del receptor AMPA/Kainato y antagonista del sitio de unión a glicina del receptor NMDA	15 min antes de la fase de muestra	1 μ l a una concentración de 1,76 μ g/ μ l en suero salino al 0,9 %	(Winters & Bussey 2005)
DL-AP5 (Ascent, Asc-271)	Antagonista del receptor NMDA	15 min antes de la fase de muestra	2 μ l a una concentración de 7 μ g/ μ l en suero salino al 0,9 %	(Winters & Bussey 2005)
LY367385 (Sigma-Aldrich, L4420)	Antagonista metabotrópico selectivo del receptor de glutamato 1a (mGluR1a)	20 min antes de la fase de muestra	1 μ l a una concentración de 2 μ g/ μ l en suero salino al 0,9 %	(Naie & Manahan-Vaughan 2005; Simonyi et al 2007)
KN-62 (Ascent, Asc-271)	Inhibidor selectivo de la proteína quinasa II dependiente de Ca/Calmodulina de cerebro de rata (CaMKII)	10 min antes de la fase de muestra	2 μ l a una concentración de 35 ng/ μ l en DMSO al 2 % en suero salino al 0,9 %	(Tinsley et al 2009)
U0126 (Ascent, Asc-241)	Inhibidor selectivo no competitivo de MAP quinasa quinasa (MKK)	30 min antes de la fase de muestra	0,5 μ l a una concentración de 2 μ g/ μ l en DMSO al 50 %	(Apergis-Schoute et al 2005)
ZIP (Tocris, 2549)	Inhibidor de la proteína quinasa Mizeta (PKM ζ)	24 h antes de la fase de muestra	2 μ l a una concentración de 30 nmol/ μ l en PBS+0,1 M de ácido acético	(Li et al 2011)
TIQ-A (Sigma, T2825)	Inhibidor de la Poli[ADP]-Ribosa polimerasa 1 (PARP-1) (inhibición de la ribosilación)	5 min antes de la fase de muestra	1 μ l en DMSO al 100 % en suero salino a una concentración final de 300 nM	(Fontan-Lozano et al 2010)

2.2 Metodología

Nota: La metodología utilizada en este bloque referente a la producción de lentivirus y el test de ORM se describe en los apartados III.1.2.1 y III.1.2.4 respectivamente.

2.2.1 Implantación de cánula e inyección de lentivirus

Previo al procedimiento quirúrgico, las ratas fueron anestesiadas con la administración por vía intraperitoneal de 75 mg/kg de ketamina (Imalgene 1000, Merial Laboratorios) y medetomidina (Domtor, Pfizer) a la dosis de 1 mg/kg. Una vez anestesiados se colocaron sobre un aparato estereotáxico de rata (Stoelting) (Cetin et al 2006). Para estos estudios donde la administración se realizó a través de una cánula, se implantó en el cráneo del animal una cánula guía (Plastics one, C317G) en el área V2 del hemisferio derecho (ver coordenadas en el apartado III.1.2.2.2). Dicha cánula se fijó al cráneo mediante 3 tornillos (Plastics one, 0-80X1-8) y cemento acrílico Resirapid (Garcia y Brückner) cubriéndose el orificio expuesto con la ayuda de una cánula *dummy* (Plastics one, C317DC). Al día siguiente de la implantación de la cánula, tras anestesiar al animal de nuevo, se realizó la infusión de 2 μ l de lentivirus (RGS14 o vehículo) a un flujo de 10 μ l/h con la ayuda de una cánula de inyección (Plastics one, C317I) que se insertó en la cánula guía (figura 19). La cánula de inyección se conectó a través de un sistema de tubos de plástico a la jeringa Hamilton, acoplada a su vez a la bomba de infusión.

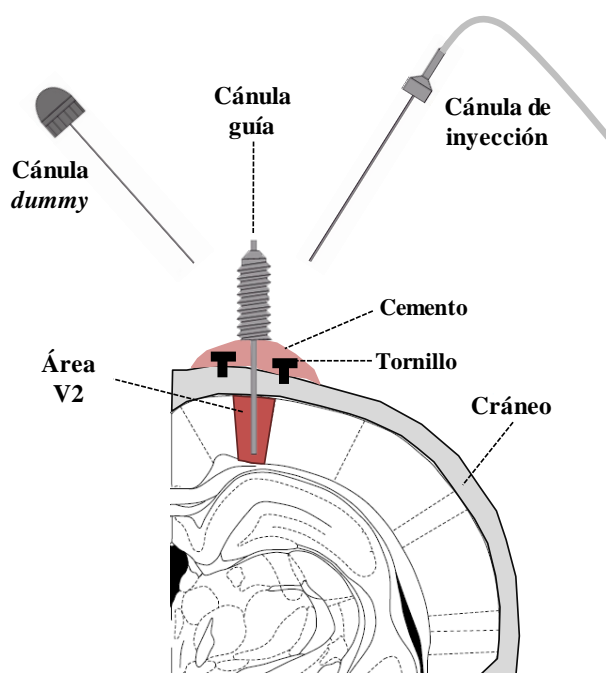


Figura 19. Representación esquemática del sistema de cánulas utilizado para realizar microinyecciones unilaterales en el área V2. La cánula guía se insertó en el cerebro y se fijó al cráneo de la rata mediante cemento acrílico y tornillos de acero inoxidable. Se muestran también la cánula *dummy* y la cánula de inyección.

Tras 21 días desde la inyección de los lentivirus, se realizó la administración de los distintos fármacos con la ayuda de la cánula de inyección y permaneciendo el animal consciente en todo momento.

Los animales se mantuvieron en las mismas condiciones de estabulación que en el primer bloque experimental (apartado III.1.2.2.1) y se siguió un tratamiento de recuperación post quirúrgica (apartado III.1.2.2.2.3). Los estudios comportamentales fueron realizados y analizados como se describe anteriormente (apartados III.1.2.4), excepto la simulación de la inserción de la cánula de inyección, que incluye la introducción y extracción de la cánula *dummy* varias veces.

3 Tercer bloque experimental: Determinar la relación entre el efecto potenciador de la memoria mediado por la proteína RGS14₄₁₄ y los receptores AMPA

3.1 Diseño experimental

Considerando la implicación de los receptores AMPA en el procesamiento de la memoria episódica (Griffiths et al 2008; Malkova et al 2015; Winters & Bussey 2005) y el efecto de RGS14 en el aumento de la memoria de objetos (Lopez-Aranda et al 2009), en este apartado se procedió a explorar la posible relación entre la familia de los receptores AMPA y el efecto potenciador de la proteína RGS14. Para ello se realizó un estudio génico y proteico de los receptores AMPA en animales tratados con el gen RGS14 como se muestra en la figura 20.

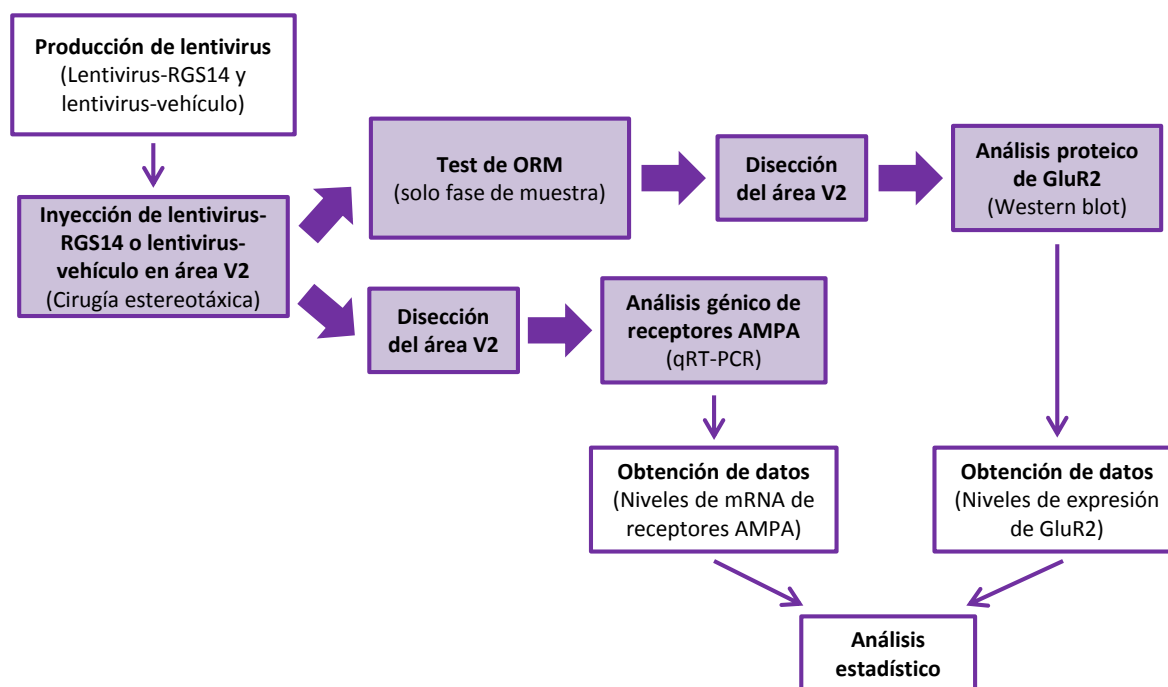


Figura 20. Esquema del diseño experimental.

3.1.1 Análisis génico de los receptores AMPA

Se utilizaron 8 ratas de entre 3-4 meses de edad tratadas con lentivirus-RGS14 y 8 ratas tratadas con lentivirus-vehículo ambos en el área V2 de la corteza visual (apartados III.1.2.1 y III.1.2.2.2). Tras 21 días desde la inyección, se extrajo el área V2 (apartado III.3.2.1) y se procesó el tejido para el desarrollo del análisis génico mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR) (apartado III.3.2.2).

3.1.2 Análisis proteico de la expresión de la subunidad GluR2

Se utilizaron 24 ratas de entre 3-4 meses: ambos grupos RGS y vehículo formados por 12 ratas tratadas en el área V2 de la corteza visual (apartados III.1.2.1 y III.1.2.2.2). Estas ratas, tras 21 días desde la inyección, se sacrificaron en grupos de 3 animales a los 20, 40, 60 min y 24 h después de mostrarles los dos objetos iguales de la fase de muestra del test de ORM (apartado III.1.2.4.1). Tras el procesamiento de las muestras se llevó a cabo el estudio de la expresión de la subunidad GluR2 mediante la técnica de Western blot (apartado III.3.2.3).

3.2 Metodología

Nota: La metodología utilizada en este bloque referente a la producción e inyección de lentivirus y el test de ORM se describe en los apartados III.1.2.1, III.1.2.2 y III.1.2.4.

3.2.1 Disección del área V2 de la corteza visual del cerebro de rata

Los animales se anestesiaron con una mezcla de isoflurano/oxígeno y se sacrificaron por decapitación. Se extrajo el cerebro rápidamente y con una cuchilla se hizo un corte sagital separando los dos hemisferios. Mediante un *punch* estéril para biopsia de un diámetro de 4 mm (DH Material Médico, 94158BP-40F) se diseccionó el área V2 de la corteza visual del hemisferio derecho en los animales de ambos grupos.

3.2.2 qRT-PCR

Las muestras se colocaron en tubos de 1,5 ml con *RNAlater® RNA Stabilization Reagent* (Quiagen, 1018087) en la proporción de 10 μ l de reactivo por miligramo de tejido almacenándose hasta su utilización.

3.2.2.1 Extracción del RNA total

El RNA total de los tejidos se aisló utilizando el *RNeasy Tissue Mini kit* (Quiagen, 74124) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante (apéndice 1.d). La cuantificación de la cantidad de RNA aislado se llevó a cabo a través de la medición de la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro *Nanodrop1000*, v3.7 (Thermo Scientific) teniendo en cuenta que una unidad de A_{260} equivale a 40 μ g/mL de RNA. Para la estimación de su pureza, se determinó asimismo la absorbancia a 280 nm y se calculó el cociente A_{260}/A_{280} , índice que informa de la pureza del RNA extraído. Los valores obtenidos en las muestras de RNA entre 1,8-2, indican una baja contaminación proteica.

3.2.2.2 Transcripción inversa (RT) del RNA total

Para la eliminación del DNA genómico de las muestras de RNA purificadas anteriormente, se llevó a cabo la reacción que se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Reacción de eliminación del DNA genómico.

COMPONENTE	CANTIDAD
10X DNase Buffer (Ambion, AM2235)	1,4 µl
rDNase I (2 U/µl) (Ambion, AM2235)	0,2 U
Muestra RNA	1 µg
Nuclease-Free Water (Gibco, 10977)	hasta 14 µl
Volumen total	14 µl

Esta reacción se realizó en un termociclador (PCR Sprint, Thermo Electro corporation) según las condiciones térmicas indicadas en la tabla 13.

Tabla 13. Condiciones térmicas de la reacción de eliminación del DNA genómico.

FASE	TEMPERATURA	TIEMPO
Activación de la rDNase	37 °C	30 min
Inactivación de la rDNase	75 °C	10 min
Etapas final	4 °C	--

Para llevar a cabo la reacción de transcripción inversa se utilizó el kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, 4387406) tal y como se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Reacción de transcripción inversa.

COMPONENTE	VOLUMEN
2X RT Buffer Mix	16 µl
20X RT Enzyme Mix	1,6 µl
Muestra RNA (resultado digestión DNA genómico)	14 µl
Nuclease-Free Water (Gibco, 10977)	0,4 µl
Volumen total	32 µl

La reacción se realizó de nuevo en el termociclador según las condiciones térmicas indicadas en la tabla 15.

Tabla 15. Condiciones térmicas de la reacción de transcripción inversa.

FASE	TEMPERATURA	TIEMPO
Activación de la transcriptasa inversa	37 °C	30 min
Inactivación de la transcriptasa inversa	95 °C	5 min
Etapa final	4 °C	--

Al igual que en el apartado anterior, para la cuantificación de la concentración y la pureza del cDNA obtenido se utilizó el espectrofotómetro *Nanodrop 1000*, v3.7. En este caso, una unidad de A_{260} equivale a 33 $\mu\text{g/mL}$ de cDNA.

3.2.2.3 Cebadores para la qRT-PCR

3.2.2.3.1 Diseño de cebadores

Para llevar a cabo las reacciones de qRT-PCR se usaron los cebadores descritos en la tabla 16. Estos cebadores se diseñaron y seleccionaron mediante el programa *Primer Express*, v.2.0 (Applied Biosystems). Se comprobó su especificidad utilizando el programa *Primer-Blast* (NCBI) (Ye et al 2012) y se realizó finalmente una simulación con el programa *Amplify 1.2* (University of Wisconsin).

Tabla 16. Secuencia de los cebadores empleados en las reacciones de qRT-PCR.

GEN AMPLIFICADO	REFERENCIA (GenBank)	SECUENCIAS CEBADORES* ¹ (5'→3')	TAMAÑO AMPLICÓN (bp)
Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1 (GluR1)	NM_031608.1	Sentido: ATGGCATCGGGTACCACTACA	100
		Antisentido: AGCTGGAAACCTGTACATTGG	
Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2 (GluR2)	NM_017261.2	Sentido: TGGAGAGCTTGCTACGGGAAA	100
		Antisentido: ACTCATGAAGGGCTTGGAGAAG	
Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3 (GluR3)	NM_001112742.1	Sentido: CTGAGAAGCCCTTCCATTTGAA	90
		Antisentido: AGAACTGGGAGCAGAAAGCATT	
Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4 (GluR4)	BC093608.1	Sentido: TCAAGGGCTGACTGGGAATG	90
		Antisentido: GGTCCTGTGCTTTTCAGTTCAA	
Ribosomal protein L19 (Rpl19)* ²	NM_031103.1	Sentido: ATGCCAACTCTCGTCAACAG	102
		Antisentido: AGGTGTTCTCCGGCATCG	

*¹ Los cebadores se sintetizaron por Sigma-Aldrich.

*² Gen de referencia "Housekeeping"

3.2.2.3.2 Determinación de la concentración óptima de los cebadores

Para determinar la concentración óptima de cada pareja de cebadores, se realizó una reacción de qRT-PCR, cuyo procedimiento se explicará más adelante (apartado III.3.2.2.5). Se emplearon tres concentraciones distintas de cebadores (0,45; 0,225 y 0,1125 μM), con tres diluciones de muestra de cDNA control (640, 320 ó 160 ng). La determinación de la concentración óptima de los cebadores se explica en el apéndice 1.d.2, siendo en este caso de 0,45 μM .

3.2.2.4 Obtención de curvas estándar

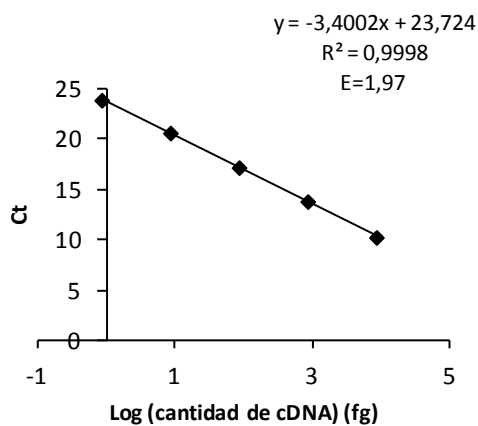
Se purificaron los productos de PCR para cada gen (empleando la concentración óptima de cebadores) según el *MiniElute PCR purification kit* (Quiagen, 28004) (apéndice 1.c.1) y se determinaron sus concentraciones en el espectrofotómetro *Nanodrop 1000*, v3.7.

Para la obtención de las curvas estándar, se llevó a cabo una reacción de qRT-PCR (apartado III.3.2.2.5) con diluciones seriadas 1:10 en el intervalo de 10^{-9} hasta 10^{-4} del producto de PCR purificado para cada gen, y posteriormente, se representó el valor Ct con respecto al logaritmo de la cantidad de cDNA en femtogramos (figura 21). Se descartaron los Ct que no mantuviesen la correlación de 3,3 ciclos entre dos diluciones 1:10 consecutivas. Se admitieron los valores de curva estándar lineal con un $R^2 > 0,98$ y La eficiencia de amplificación para cada reacción (E) se calculó según la pendiente de la curva mediante la fórmula:

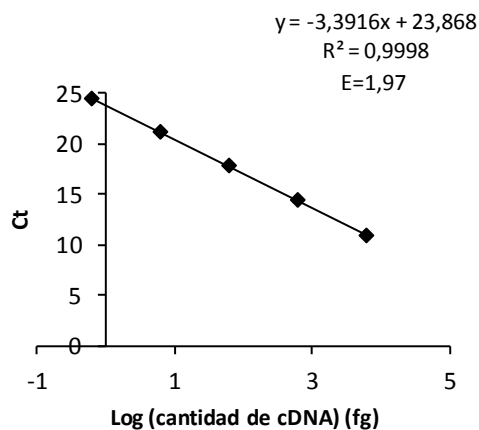
$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

En la figura 21 se muestran las curvas estándar para los genes GluR1, GluR2, GluR3, GluR4 y el gen de referencia Rpl19.

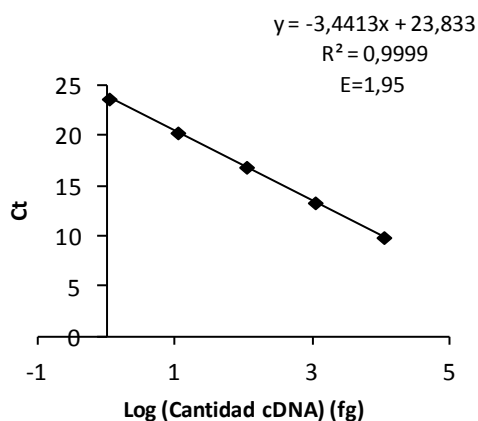
GluR1



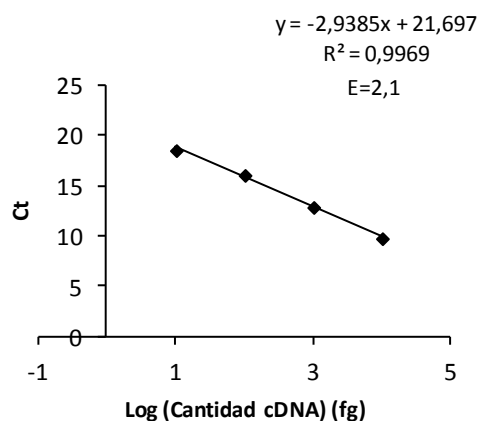
GluR2



GluR3



GluR4



Rpl19 (gen de referencia)

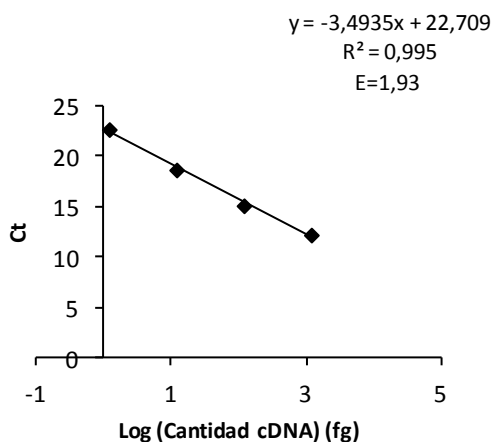


Figura 21. Curvas estándar obtenidas para los genes GluR1, GluR2, GluR3, GluR4 y Rpl19. Se muestra la correlación entre el logaritmo de la cantidad de cDNA (fg) y el Ct, para diluciones seriadas de cDNA. E: eficiencia de la amplificación, R²: coeficiente de correlación.

3.2.2.5 Reacción de qRT-PCR

Se realizó en un termociclador *7500 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems), utilizando el kit *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, 4367659) en un volumen total de 24 μl tal y como se muestra en la tabla 17 manteniendo las reacciones a 4 °C en todo momento.

Tabla 17. Reacción de qRT-PCR empleando el kit *Power SYBR® Green PCR Master Mix*.

COMPONENTE	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Power SYBR® Green PCR Master Mix (2X)	12 μl	1X
Cebador sentido	8 μl	0,45 μM (cada uno)
Cebador antisentido		
Muestra cDNA	4 μl	640 ng
Total	24 μl	

Las muestras se amplificaron por triplicado, incluyendo controles negativos (sin muestra), en placas de 96 pocillos para reacciones ópticas *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode* (Applied Biosystems, 4306737). Estas placas se cubrieron y sellaron mediante una película transparente *qPCR Adhesive Clear Seals* (4titude, 4ti-0560) y se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5810R, rotor A-4-62) durante 1 min a 1000 rpm a 4 °C antes de ser introducidas en el termociclador.

Las condiciones térmicas de la amplificación así como del protocolo para la obtención de las curvas de disociación se detallan en la tabla 18. Las curvas de disociación se visualizaron mediante el programa específico del termociclador utilizado (7500 V.2.0.6).

Tabla 18. Ciclos y temperaturas de la qRT-PCR.

FASE		TEMPERATURA	TIEMPO
Activación de la enzima		95 °C	10 min
40 ciclos	Desnaturalización	95 °C	15 s
	Alineación y extensión	60 °C	1 min
Curvas disociación		95 °C	15 s
		60 °C	1 min
		95 °C	30 s
		60 °C	15 s
Etapa final		4 °C	--

3.2.2.6 Obtención de datos

Para determinar la cantidad de RNA (cDNA) en las muestras se interpolaron los valores Ct obtenidos para cada gen en las rectas de las curvas estándar correspondientes. Los valores de cantidad de RNA de los distintos genes (GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4) obtenidos tanto para el grupo-RGS14 como el grupo-vehículo se normalizaron con respecto a los alcanzados para el gen Rpl19 (gen de referencia, “housekeeping”) ($\text{Cantidad}_{\text{gen}} / \text{Cantidad}_{\text{Rpl19}}$). Posteriormente, los valores de cantidad normalizados ($\text{Cantidad}_{\text{gen nor}}$) para cada gen en ambos grupos, se usaron para calcular el porcentaje de cambio de los niveles de estos genes con respecto al vehículo mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Cantidad}_{\text{gen nor RGS14}} - \text{Cantidad}_{\text{gen nor Vehículo}}}{\text{Cantidad}_{\text{gen nor Vehículo}}} \times 100$$

3.2.2.7 Análisis estadístico

Los valores obtenidos se expresaron como media \pm SEM. El posterior análisis de significancia se calculó mediante pruebas t de *Student* apareadas de los valores de cantidad de RNA normalizados para los grupos RGS y vehículo, usando el paquete estadístico SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific) y aceptándose un nivel de confianza del 95 % y una probabilidad de error del 5 % ($p \leq 0,05$).

3.2.3 Western Blot

3.2.3.1 Homogeneización del tejido cerebral y determinación de la concentración de proteínas

Tras la disección del área V2, el tejido de cerebro fresco (en torno a 40 mg por tubo) se homogeneizó mediante un homogenizador (Glas-Col) en 2 ml de tampón Tris-HCl 0,01M, pH 7,4 (apéndice 5.a.1) que incluía un *cocktail* de inhibidores de proteasas al 1 % (v/v) (Sigma-Aldrich, P8340) y un *cocktail* de inhibidores de fosfatasas al 1 % (v/v) (Sigma-Aldrich, P0044). La concentración de proteínas de las muestras se estimó mediante el método de Lowry (Lowry et al 1951) (apéndice 5.b). Una vez calculada, las muestras se liofilizaron y conservaron a -80 °C hasta su uso.

3.2.3.2 Electroforesis SDS-PAGE e inmunoblot

Las muestras liofilizadas se trataron con tampón de carga (1X) (Laemmli 1970) (apéndice 5.a.3) y se sometieron a 95 °C durante 10 min en un baño seco por 2 veces. Se cargaron 2,5 y 5 µg de proteína junto al marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ ladder* (Bio-Rad, 161-0374) en un gel de poliacrilamida-SDS en gradiente 4-20 % (Bio-Rad, 456-1096). El potencial eléctrico aplicado fue de 150 V y se utilizó el tampón Tris-Glicina-SDS (TGS) (apéndice 5.a.4). Las proteínas se transfirieron posteriormente a una membrana de PVDF (Bio-Rad, 1704156) usando el sistema de transferencia *Turbo Trans-Blot* (Bio-Rad). Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (leche desnatada en polvo al 10 % (p/v) y BSA al 2 % (Sigma-Aldrich, A3059) en tampón PBS-Tween) (apéndice 5.a.6) durante 3 h a temperatura ambiente y en agitación. Tras 3 lavados con PBS-Tween, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4 °C y en agitación. Los anticuerpos primarios empleados fueron: el anticuerpo monoclonal de conejo frente a GluR2 (Abcam, ab133477) a una dilución 1:5000 y el anticuerpo monoclonal de ratón frente a GAPDH (utilizado como control de carga) (Sigma-Aldrich, G8795) a una dilución 1:40000. Al día siguiente, las membranas se lavaron con PBS-Tween y se incubaron durante 75 min a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes: el anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo (Vector lab, BA-1000) y el anticuerpo biotinilado anti-IgG de ratón (Vector lab, BA-9200) a una dilución 1:500. Todos los anticuerpos se diluyeron en una solución de leche desnatada en polvo al 5 % (p/v), BSA al 2 % y azida sódica al 0,1 % (Sigma-Aldrich, S2002) en tampón PBS-Tween. Pasados los 75 min de incubación, las membranas se volvieron a lavar con PBS-Tween y se incubaron en una solución de ExtrAvidina conjugada con peroxidasa (Sigma-Aldrich, E2886) a una dilución 1:2000 en PBS-Tween durante 50 min a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se volvieron a lavar con PBS-Tween antes de proceder al revelado mediante el método colorimétrico de DAB, empleando el sistema *DAB Enhanced liquid substrate system* (Sigma-Aldrich, D3939).

3.2.3.3 Obtención de datos

Tras el secado de las membranas en una estufa a 37 °C, se escanearon y analizaron mediante el programa *Quantity One 4.6.3* (Bio-Rad). Los valores de densidad óptica de las bandas de la proteína GluR2 obtenidos tanto para el grupo-RGS14 como para el grupo-vehículo en los distintos tiempos (20, 40, 60 min y 24 h) se normalizaron con respecto a los

obtenidos para la proteína GAPDH (control de carga) ($OD_{\text{GluR2}} / OD_{\text{GAPDH}}$). Posteriormente, los valores de densidad óptica normalizados ($OD_{\text{GluR2 nor}}$) en ambos grupos, se usaron para calcular el porcentaje de cambio de los niveles de la proteína GluR2 en el grupo-RGS14 con respecto al grupo-vehículo mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{O.D_{\text{GluR2 nor}} \text{ RGS14} - O.D_{\text{GluR2 nor}} \text{ Vehículo}}{O.D_{\text{GluR2 nor}} \text{ Vehículo}} \times 100$$

3.2.3.4 Análisis estadístico

Los valores obtenidos se expresaron como media \pm SEM. El posterior análisis de significancia se calculó mediante pruebas t de *Student* apareadas de los valores de densidad óptica normalizados para los grupos RGS y vehículo, usando el paquete estadístico SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific) y aceptándose un nivel de confianza del 95 % y una probabilidad de error del 5 % ($p \leq 0,05$).

4 Cuarto bloque experimental: Examinar el efecto del tratamiento con RGS14₄₁₄ sobre la plasticidad sináptica hebiana en la corteza perirrinal

4.1 Diseño experimental

Para estudiar la posible relación entre el aumento de la memoria tras el tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ y la plasticidad sináptica hebiana, se realizaron registros extracelulares *in vitro* de potenciales de campo en la corteza perirrinal, al ser una de las áreas de la corteza cerebral más estudiadas para delinear los correlatos electrofisiológicos del procesamiento de ORM (Brown & Aggleton 2001; Kim et al 2014; Lech & Suchan 2013; Martin et al 2013; Ranganath & Ritchey 2012; Warburton & Brown 2010; Watson & Lee 2013). No obstante antes de llevar a cabo los estudios electrofisiológicos se realizó un test de ORM para confirmar que dicho tratamiento sobre la corteza perirrinal producía un aumento de la ORM similar al encontrado en el área V2. El diseño experimental planteado en este bloque se muestra en la figura 22.

Nota: Los estudios electrofisiológicos se llevaron a cabo durante el desarrollo de mi estancia de investigación de 7 meses en el grupo del Dr Zafar I. Bashir en la Universidad de Bristol (Reino unido). No obstante, los resultados de los experimentos de despotenciación son una representación tanto de los resultados adquiridos por mí en la Universidad de Bristol como de los obtenidos en colaboración con el grupo del Dr. Robert Nisticó en la Universidad de Roma (Italia).

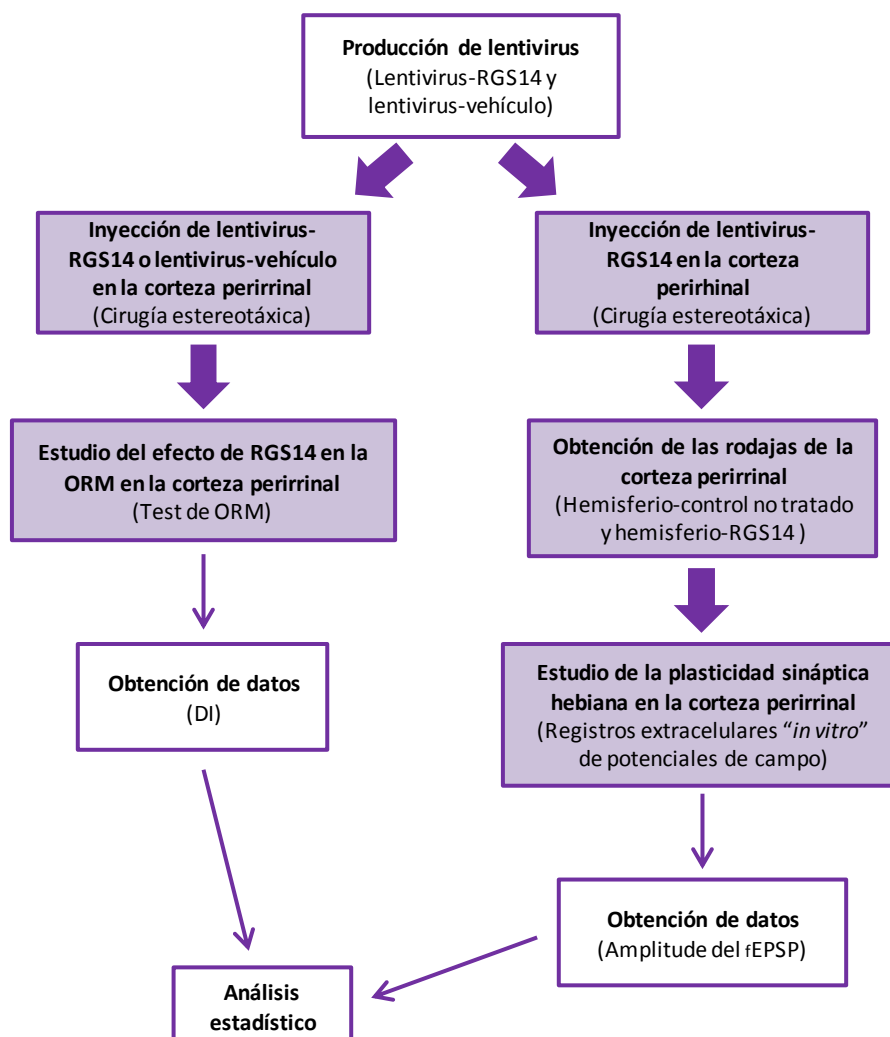


Figura 22. Esquema del diseño experimental

4.1.1 Efecto del gen RGS14₄₁₄ en la corteza perirrinial sobre la ORM

Se emplearon 16 ratas de entre 3-4 meses de edad: un grupo-RGS14 formado por 8 ratas tratadas con lentivirus-RGS14₄₁₄ y un grupo-vehículo formado por 8 ratas tratadas con lentivirus-vehículo ambos en la corteza perirrinial (AP: -4,52, ML: ± 6,7, DV: -4,75)

(apartados III.1.2.1 y III.1.2.2.2). A estos animales se les realizó un test de ORM con un tiempo de demora de 24 h (apartado III.1.2.4).

4.1.2 Análisis del efecto de RGS14₄₁₄ en la plasticidad sináptica mediante registros extracelulares *in vitro* de potenciales de campo

Se utilizaron 29 ratas de entre 3-4 meses de edad tratadas con lentivirus-RGS14₄₁₄ en la corteza perirrinal en uno de los dos hemisferios (apartados III.1.2.1 y III.1.2.2.2). Los cortes de corteza perirrinal obtenidos del hemisferio tratado con lentivirus-RGS14₄₁₄ representarían el grupo-RGS14 mientras que los cortes del hemisferio no tratado representarían el grupo-control. A partir de estas rodajas de corteza perirrinal se llevaron a cabo registros extracelulares *in vitro* de potenciales de campo (apartado III.4.2.1).

4.2 Metodología

Nota: La metodología utilizada en este bloque referente a la producción e inyección de lentivirus y el test de ORM se describe en los apartados III.1.2.1, III.1.2.2 y III.1.2.4.

4.2.1 Electrofisiología en rodajas

4.2.1.1 Preparación de las rodajas de la corteza perirrinal de rata

Los animales se anestesiaron con una mezcla de isoflurano/oxígeno y se sacrificaron por decapitación. Se extrajo el cerebro rápidamente y se sumergió en líquido cefalorraquídeo artificial modificado (mACSF, rico en sacarosa) (apéndice 6.1) a 5 °C estabilizado con gas carbónico (95 % O₂ y 5 % CO₂). Para separar los dos hemisferios, con la ayuda de una cuchilla se hizo un corte sagital. Se retiraron las partes rostrales del cerebro con un corte vertical y las caudales mediante un corte diagonal con un ángulo de inclinación de 45° respecto al eje dorsoventral (figura 23). Cada hemisferio se fijó por su parte caudal a la base de la cámara del vibratomo (Campden Instruments) con una capa delgada de cianoacrilato (Superglue, Loctite) y se cubrió con mACSF.

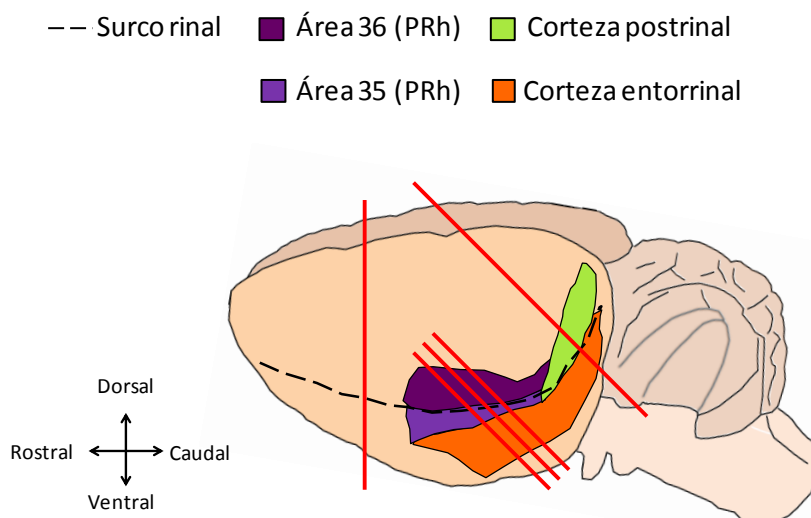


Figura 23. Representación esquemática de una vista lateral de un hemisferio de cerebro de rata. Se muestra la localización de la corteza perirrinal (áreas 35 y 36 de Brodmann), la corteza entorrinal, la corteza postrinal y el surco rinal. Las líneas diagonales muestran el ángulo aproximado en el cual las rodajas de cerebro se cortan.

Se obtuvieron cortes coronales de cerebro de rata de 400 μm que contenían la corteza perirrinal (área 35 y 36) (figura 24), y se transfirieron a un cámara de incubación con ACSF (apéndice 6.2) a 20-25 $^{\circ}\text{C}$ estabilizado con gas carbógeno durante 1-6 h, manteniendo los cortes de cerebro de cada hemisferio separados. Para disminuir los sesgos, se llevaron a cabo experimentos a doble ciego, ya que el experimentador desconocía cuál era el hemisferio tratado en la rata.

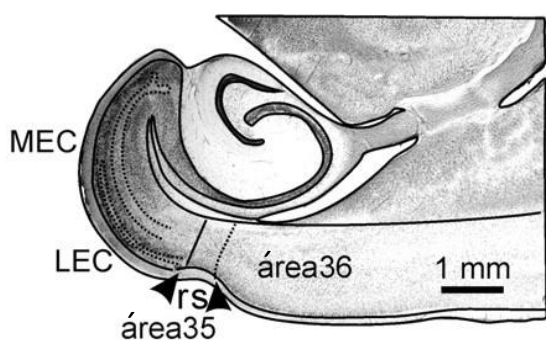


Figura 24. Rodaja de cerebro de rata obtenida mediante un ángulo de corte de 45° y teñida con la técnica de Nissl. Se muestra la localización de la corteza perirrinal (áreas 35 y 36 de Brodmann), la corteza entorrinal medial (MEC), la corteza entorrinal lateral (LEC) y el surco rinal (rs) (modificado de Kajiwara et al 2003).

4.2.1.2 Registros extracelulares *in vitro* de potenciales de campo

Los potenciales post-sinápticos de excitación de campo (fEPSP) se registraron mediante un electrodo de registro situado directamente por debajo del surco rinal en las capas

II/III de la corteza perirrinal (área 35). A los dos lados del electrodo de registro se colocaron los electrodos de estimulación (~ 0,5 mm) (figura 25).

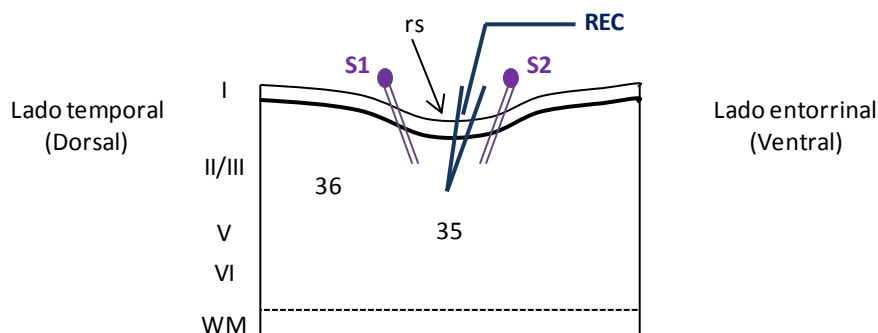


Figura 25. Representación esquemática de una rodaja de corteza perirrinal mostrando la posición del electrodo de registro (REC) y los electrodos de estimulación (S1 y S2). Se representa también la localización de la corteza perirrinal (áreas 35 y 36 de Brodmann), el surco rinal (rs), la posición aproximada de las capas corticales I-VI y la sustancia blanca (WM) (modificado de Cho et al 2000b).

Para garantizar la especificidad del efecto de la plasticidad sináptica, se examinaron dos vías: “la vía entorrinal” en la que interviene el electrodo situado en el área 35 y “la vía temporal” en la que interviene el electrodo situado en el área 36 (Massey et al 2004; Ziakopoulos et al 1999). El posicionamiento de los electrodos tanto de registro como de estimulación se realizó con la ayuda de un microscopio (MS-5, Leica Microsystems) y una fuente de luz fría (KL-200, Schott).

(i) Sistema de perfusión

Una vez colocada la rodaja de cerebro de rata sobre la cámara de registro, se perfundió con un flujo constante de ACSF establecido por gravedad a una velocidad de 2 ml/min mediante una bomba peristáltica (Watson-Marlow) y a través de un sistema de tubos de plástico (ID 1.4 mm, OD 1.9 mm, Portex) previamente calentados. El ACSF fue burbujeado continuamente con gas carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂). La temperatura final del medio en la cámara de registro fue de 28 °C-32 °C, (oscilación máxima en cada experimento 0,5 °C). El nivel de ACSF en la cámara se mantuvo constante al retirarse el medio residual mediante un sistema de succión formado por una aguja conectada a una bomba de vacío (Charles Austen Pumps).

(ii) Electrodo de estimulación

Los electrodos bipolares de estimulación, se elaboraron manualmente con un alambre trenzado de níquel-cromo (Advent Research Materials, NI653514), que atravesaba un capilar de borosilicato de 1.5 mm OD, 0,86 mm ID (Harvard Apparatus, 30-0057). Para poder ajustar la longitud del alambre que sobresale del capilar de vidrio, se utilizó la masilla adhesiva *Blue TackTM* (Bostik). Estos electrodos se montaron en los micromanipuladores (M-152, Narishige) que a su vez se anclaron a la mesa antivibratoria (VM-3046, Newport Spectra-Physics) con la ayuda de bases magnéticas (GJ8, Narishige,). Se emitieron estímulos de voltaje constante de 0,1 ms de duración, obtenidos desde una unidad aisladora de estímulo (DS2A-Mk.II, Digitimer) controlada por ordenador a través del software de adquisición de datos WinLTP, v.1.01 (Anderson & Collingridge 2007; Anderson et al 2012).

(iii) Electrodo de registro

Para el registro de señales, se utilizó un electrodo de registro elaborado con un capilar de borosilicato de 1.5 mm OD, 0,86 mm ID que se estiró con la ayuda de un estirador de pipetas (P-84, Sutter Instruments) cuyas condiciones se ajustaron para obtener electrodos con una resistencia de entre 3-5 M Ω . Posteriormente la pipeta se llenó con la misma solución extracelular de registro (ACSF) y se conectó al soporte del electrodo (Axon instrument). Este soporte iba conectado a su vez al cabezal del amplificador (CV203BU, Axon instrument). En el soporte del electrodo se encontraba un alambre de plata parcialmente clorado (Advent research material, AG5485) que quedaba en contacto con la solución extracelular de registro, proporcionando así una continuidad eléctrica entre la solución de registro extracelular y el cabezal del amplificador. Este cabezal se montó en un micromanipulador motorizado (SM-5, Luigs & Neumann) que permitió realizar movimientos finos del electrodo de registro en los tres ejes del espacio. Como electrodo de referencia (de tierra) se usó otro electrodo formado por un alambre de plata parcialmente clorado conectado a la solución del baño mediante un pellet (Modelo E206, 641310, Harvard apparatus) y al cabezal del amplificador.

(iv) Protocolos de estimulación

Se aplicó un estímulo único de forma alterna mediante cada electrodo de estimulación a una frecuencia de 0,033 Hz (es decir, un estímulo cada 30 s para cada vía: vía

entorrinal y vía temporal) por lo cual el tejido se estimulaba alternativamente cada 15 s. Para obtener una línea base de transmisión sináptica antes de inducir la plasticidad sináptica, se ajustó la intensidad de la estimulación alcanzándose registros correspondientes a un 50-60 % de la respuesta máxima. Tras conseguir esta línea base de al menos 30 min, se llevaron a cabo los siguientes protocolos:

a) Inducción de una potenciación a largo plazo (LTP) de la respuesta sináptica a partir de dos protocolos distintos de estimulación de alta frecuencia (HFS):

- HFS-100 Hz: 4 trenes de estímulos de 1 s de duración a 100 Hz cada tren, con un intervalo de 30 s entre trenes (Massey et al 2004; Ziakopoulos et al 1999).
- HFS-20 Hz: 1 tren de estímulos de 1 s de duración a 20 Hz.

b) Inducción de la depresión a largo plazo (LTD) de la respuesta sináptica dependiente de receptores colinérgicos muscarínicos mediante la administración durante 10 min de un agonista colinérgico no selectivo, carbacol (CCh) (abcam, ab141354) a una concentración de 50 μ M o 20 μ M (Massey et al 2001).

c) Inducción de la despotenciación (reversión de la LTP) de la respuesta sináptica mediante un protocolo de estimulación de baja frecuencia (LFS, 900 estímulos a 1 Hz durante 15 min) 20 min después de inducir la LTP según diferentes autores (Massey et al 2004; Ziakopoulos et al 1999).

Los picos de amplitud de fEPSP obtenidos se midieron durante los 60 min posteriores a la inducción de la plasticidad sináptica en cada caso (después de los 2 min de inducción de HFS, de los 15 min de inducción de LFS o de los 10 min de la aplicación de CCh). La vía en la cual se indujo la plasticidad sináptica fue escogida al azar, siendo algunas veces la vía entorrinal y otras la temporal. La LTP, la LTD y la despotenciación fueron específicas de la vía estimulada no observándose ninguna plasticidad en la vía no condicionada (datos no presentados) tal y como se describe anteriormente (Cho et al 2000b; Massey et al 2004; Warburton et al 2003; Ziakopoulos et al 1999).

4.2.1.3 Obtención de datos

Las respuestas alcanzadas se monitorizaron a través de un amplificador AxoPatch 200B (Axon instrument), se amplificaron 500 veces y se filtraron con un filtro de pasa-bajos con una frecuencia de corte de 5 kHz. Estas señales se digitalizaron mediante un conversor analógico-digital a una frecuencia de muestreo de 10 kHz. El software de adquisición de datos Win LTP permite la medida de los picos de amplitud de las respuestas obtenidas simultáneamente.

4.2.1.4 Análisis estadístico

Los experimentos se analizaron posteriormente con el programa de análisis de datos WinLTP 1.01 Reanalysis (Anderson & Collingridge 2007; Anderson et al 2012). Los valores de los picos de amplitud de los potenciales post-sinápticos de excitación de campo obtenidos se calcularon con respecto a los 30 min iniciales de línea base tanto para la vía entorrinal como para la temporal en cada experimento. Los datos se expresaron como media \pm SEM y el posterior análisis de significancia en el cambio de la plasticidad sináptica se calculó mediante:

- (i) Pruebas t de *Student* desapareadas para comparar grupo-RGS14 versus grupo-control (datos normalizados).
- (ii) Prueba t de *Student* apareadas para comparar línea base versus LTP o LTD (datos brutos) en cada grupo (RGS y control).
- (iii) Un ANOVA de un factor con medidas repetidas seguido de una prueba post hoc de *Bonferroni* para comparar línea base versus LTP versus despotenciación en cada grupo.

Todo el tratamiento estadístico mencionado se realizó con el paquete estadístico *SigmaStat* 3.5 (Jandel Scientific) y aceptándose un nivel de confianza del 95 % y una probabilidad de error del 5 % ($p \leq 0,05$).

5 Quinto bloque experimental: Analizar las áreas cerebrales implicadas en la potenciación de la memoria mediada por RGS14

5.1 Diseño experimental

En este apartado se planteó estudiar el efecto potenciador de RGS14 en varias áreas del cerebro que intervienen en el procesamiento de la memoria de objetos como el área V2 y las cortezas perirrinal y frontal (apartado I.2.1.1). Además, con el objetivo de estudiar la posible independencia de cada área en el procesamiento de la memoria, se administró la inmunotoxina Ox7-SAP para producir una eliminación selectiva de neuronas en una o varias áreas cerebrales. En la figura 26 se muestra el planteamiento de los experimentos desarrollados en este bloque.

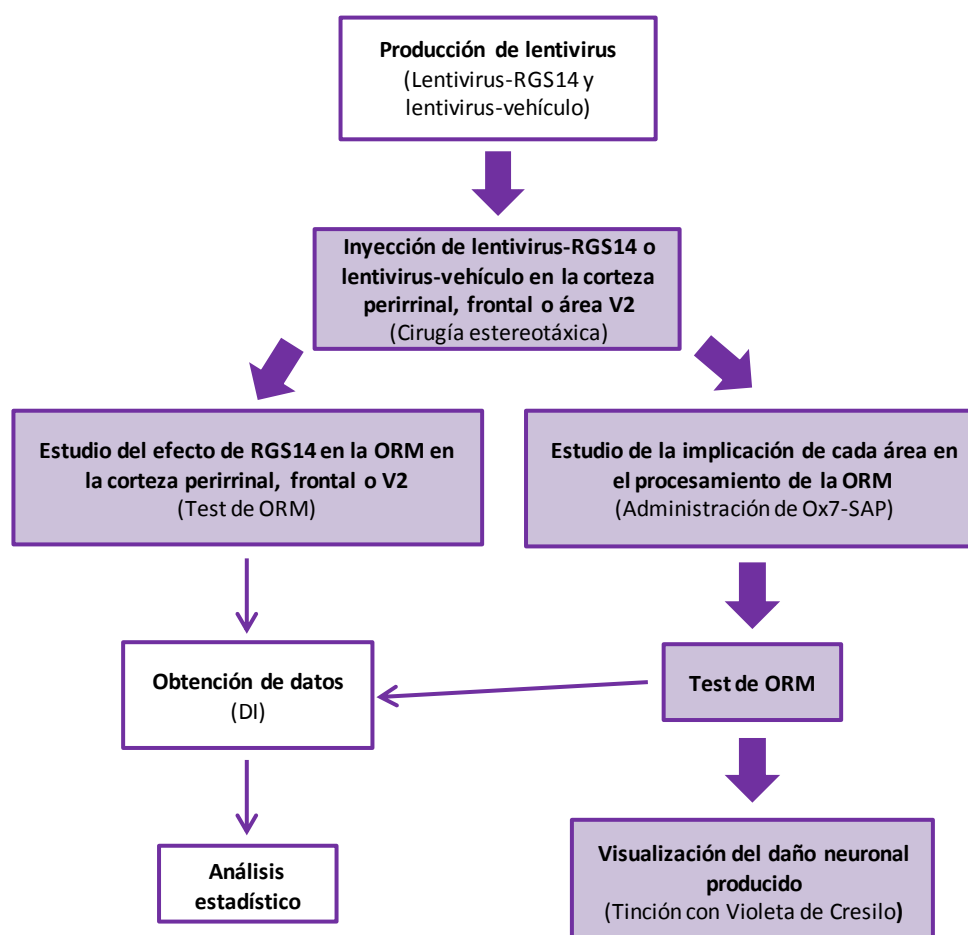


Figura 26. Esquema del diseño experimental.

5.1.1 Efecto de RGS14₄₁₄ sobre la ORM en las áreas V2, perirrinal y frontal

Se utilizaron 3 grupos de ratas de entre 3-4 meses de edad:

- (i) Grupo-V2: Ratas tratadas con lentivirus-RGS14₄₁₄ (12 ratas) o lentivirus-vehículo (12 ratas) en el área V2 de la corteza visual (AP: -4,3, ML: ± 2,1, DV: -1,9).
- (ii) Grupo-PRh: Ratas tratadas con lentivirus-RGS14₄₁₄ (8 ratas) o lentivirus-vehículo (12 ratas) en la corteza perirrinal (AP: -4,52, ML: ± 6,7, DV: -4,75).
- (iii) Grupo-Fr: Ratas tratadas con lentivirus-RGS14₄₁₄ (8 ratas) o lentivirus-vehículo (11 ratas) en la corteza frontal (AP: + 4,7, ML: ± 2,2, DV: -1).

Todos los grupos de animales realizaron un test de ORM a un tiempo de demora de 24 h (apartado III.1.2.4).

5.1.2 Estudio de la independencia de las áreas del cerebro implicadas en el procesamiento de ORM mediado por RGS14

Como se indica en las tablas (tabla 19, tabla 20 y tabla 21), se realizaron eliminaciones selectivas de neuronas en las áreas a estudio mediante la administración de Ox7-SAP a una concentración de 0,9 µg/µl (Advanced Targeting Systems, IT-02) en ambos hemisferios (Krum et al 1997; Nolan & Freeman 2005; Traissard et al 2007).

Tabla 19. Distintos tratamientos aplicados al grupo-V2.

		Grupo-vehículo	Grupo-RGS14
Tratamiento	Sin toxina	n = 12	n = 8
	Con Ox7 en V2	---	n = 8
	Con Ox7 en Fr	n = 7	n = 10
	Con Ox7 en PRh	n = 7	n = 10
	Con Ox7 en PRh y Fr	n = 7	n = 8

*En este grupo se utilizaron 44 ratas tratadas con lentiviurs-RGS14₄₁₄ y 33 ratas tratadas con lentivirus-vehículo con o sin toxina Ox7-SAP.

Tabla 20. Distintos tratamientos aplicados al grupo-PRh.

		Grupo-vehículo	Grupo-RGS14
Tratamiento	Sin toxina	n = 11	n = 7
	Con Ox7 en PRh	---	n = 10
	Con Ox7 en Fr	n = 7	n = 10
	Con Ox7 en V2	n = 7	n = 9
	Con Ox7 en Fr y V2	n = 7	n = 10

*En este grupo se utilizaron 46 Ratas tratadas con lentivirus-RGS14₄₁₄ y 32 ratas tratadas con lentivirus-vehículo con o sin toxina Ox7-SAP.

Tabla 21. Distintos tratamientos aplicados al grupo-Fr.

		Grupo-vehículo	Grupo-RGS14
Tratamiento	Sin toxina	n = 10	n = 9
	Con Ox7 en Fr	---	n = 10
	Con Ox7 en PRh	n = 7	n = 8
	Con Ox7 en V2	n = 7	n = 8
	Con Ox7 en PRh y V2	n = 7	n = 8

*En este grupo se utilizaron 43 ratas tratadas con lentivirus-RGS14₄₁₄ y 31 ratas tratadas con lentivirus-vehículo con o sin toxina Ox7-SAP.

Los 3 grupos de animales realizaron el test de ORM (apartado III.1.2.4) a un tiempo de demora de 24 h. Posteriormente se visualizó el daño neuronal producido en cada tratamiento, utilizando la tinción general de células con violeta de cresilo (apartado III.5.2.1).

5.2 Metodología

Nota: La metodología utilizada en este bloque referente a la producción e inyección de lentivirus y el test de ORM se describe en los apartados III.1.2.1, III.1.2.2 y III.1.2.4.

5.2.1 Tinción general de células con violeta de cresilo

Previo al desarrollo de esta tinción (apéndice 4 (c,d y e)), los cortes se montaron sobre portaobjetos gelatinizados (apéndice 4.b) y se dejaron durante una noche en la estufa a 37 °C para su completa adhesión. Posteriormente, los tejidos se hidrataron primero con PBS 0,1 M, durante 30 min y luego con agua destilada (30 min). A continuación, se sumergieron

en la solución de violeta de cresilo al 1 % (Sigma-Aldrich; C5042) durante 15 min. Para eliminar el exceso de colorante se lavaron 2 min en agua destilada y se procedió a su deshidratación según la siguiente secuencia: 10 segundos en etanol de 70° y 1 min en etanol de 96° con ácido acético glacial al 10 %. A continuación, se sumergieron durante 4 min en etanol absoluto y 10 min en xileno. Por último, se montaron los cortes con DPX (Merck, 1.00579). Las secciones se analizaron en el microscopio DM IRE2 de Leica.

IV. Resultados

1 Recuperación de la pérdida de memoria mediante estimulación por la proteína RGS14 en el área V2

El efecto potenciador de la proteína RGS14 (Lopez-Aranda et al 2009) se estudió en dos modelos diferentes de roedores que presentan déficit en la memoria de reconocimiento de objetos: un modelo de rata envejecida y un modelo de ratón transgénico para la enfermedad de Alzheimer.

1.1 Estudio en el envejecimiento

En la figura 27 se representan los valores de índices de discriminación (DI) (apartado III.1.2.4.3) obtenidos en los distintos grupos experimentales (control sin inyección, vehículo y RGS14). El grupo de ratas control sin inyección a los 3 meses de edad fue capaz de retener la información de un objeto al que habían sido expuestas tras un tiempo de demora de 45 min ($0,719 \pm 0,017$) pero no después de 24 h. ($0,50 \pm 0,054$); (ANOVA de un factor seguido de una prueba post hoc de *Tukey*, $p = 0,002$). Sin embargo, al alcanzar los 18 meses de edad, estas ratas perdieron la capacidad de recordar a los 45 min ($0,507 \pm 0,034$, 45 min a 18 meses versus $0,719 \pm 0,017$, 45 min a 3 meses; ANOVA de un factor seguido de una prueba post hoc de *Tukey*, $p < 0,001$).

Una vez sometidos estos mismos animales al tratamiento con el gen de RGS14₄₁₄ en el área V2 (grupo-RGS14), la pérdida de memoria observada tras un tiempo de demora de 45 min se revirtió ($0,75 \pm 0,022$; grupo-RGS14 a 45 min con 20 meses, $0,507 \pm 0,034$; grupo-control sin inyección a 45 min con 18 meses; prueba t de *Student* desapareada, $p < 0,001$). Además de esta recuperación de la ORM a los 45 min, estos animales fueron capaces de recordar después de 24 h ($0,727 \pm 0,024$; grupo-RGS14 con 20 meses, $0,507 \pm 0,054$; grupo-control sin inyección con 3 meses; prueba t de *Student*, $p = 0,003$). Este efecto se conservó incluso hasta los 24 meses de edad ($0,721 \pm 0,038$), edad hasta la cual los animales eran capaces de realizar un test de ORM. Por el contrario el tratamiento con lentivirus-vehículo (grupo-vehículo), no produjo una recuperación de la pérdida de la ORM a los 20 meses de edad a diferencia del grupo-RGS14 ($0,49 \pm 0,035$, para 45 min y $0,501 \pm 0,028$, para 24 h) y como era de esperar, tampoco a los 24 meses de edad tras 24 h ($0,496 \pm 0,041$).

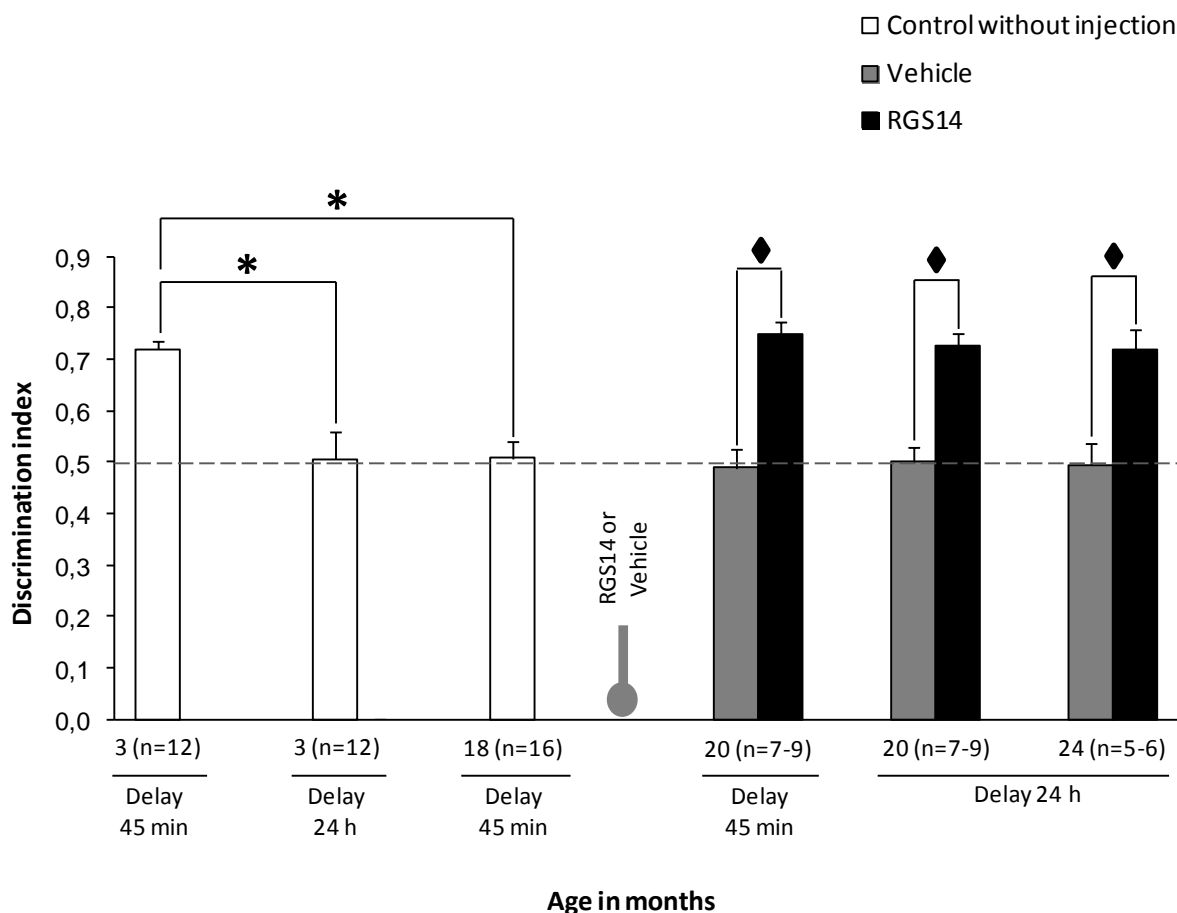


Figura 27. Recuperación de la pérdida de memoria episódica en ratas envejecidas. Al ser expuestas a un objeto durante 3 min, ratas control (sin tratamiento) de 3 meses de edad eran capaces de retener la información del objeto después de 45 min pero no tras 24 h. Sin embargo, al alcanzar los 18 meses de edad, estas ratas perdían esta capacidad de recordar después de 45 min. Un tratamiento localizado con el gen RGS14₄₁₄ en el área V2 en este modelo de déficit de memoria (18 meses de edad), dio lugar a la recuperación de la pérdida de la ORM (demora 45 min, 20 meses). Además, este tratamiento produjo un aumento de la memoria, detectable incluso tras 24 h (demora 24 h, 20 meses) y este efecto persistió hasta los 24 meses de edad (demora 24 h). (n) indica el número de ratas utilizadas en cada condición. * muestra diferencias significativas intra-grupos y ◆ muestra diferencias significativas intergrupos. ($p \leq 0,05$)

1.2 Estudio en la enfermedad de Alzheimer

En la figura 28 se observa cómo a los 2 meses de edad, tanto el modelo de ratón para AD (grupo-AD) como el grupo *wild type* control (grupo WT) mostraron una retención de la información de objetos similar ($0,754 \pm 0,025$ y $0,768 \pm 0,039$ respectivamente, prueba t de *Student* desapareada, $p = 0,795$), mientras que a los 4 meses de edad los ratones AD presentaron un déficit de la memoria ($0,560 \pm 0,021$) en comparación con el grupo-WT ($0,795 \pm 0,030$) mostrando diferencias significativas entre los dos grupos (prueba t de *Student* desapareada, $p < 0,001$). Al igual que en el modelo de envejecimiento, el tratamiento con el gen RGS14 de estos ratones AD a los 5 meses de edad (grupo-AD + RGS14) produjo una recuperación de la memoria (7 meses, $0,773 \pm 0,026$, grupo-AD+RGS14 vs $0,543 \pm 0,041$ grupo-AD, ANOVA de un factor seguido de una prueba post hoc de *Tukey*, $p < 0,001$), la

cual se mantuvo incluso hasta los 10 meses de edad ($0,698 \pm 0,037$, grupo-AD+RGS14 vs $0,523 \pm 0,067$ grupo-AD, ANOVA de un factor seguido de una prueba post hoc de *Tukey*, $p = 0,0048$) alcanzando el nivel de ORM del grupo-WT ($0,726 \pm 0,047$, para 7 meses y $0,793 \pm 0,033$, para 10 meses). Sin embargo, el tratamiento con vehículo (grupo-AD + vehículo) no revirtió el déficit de memoria presentado ($0,542 \pm 0,026$, para 7 meses y $0,534 \pm 0,045$, para 10 meses) como ocurre en el grupo-AD ($0,543 \pm 0,041$, para 7 meses y $0,523 \pm 0,067$, para 10 meses).

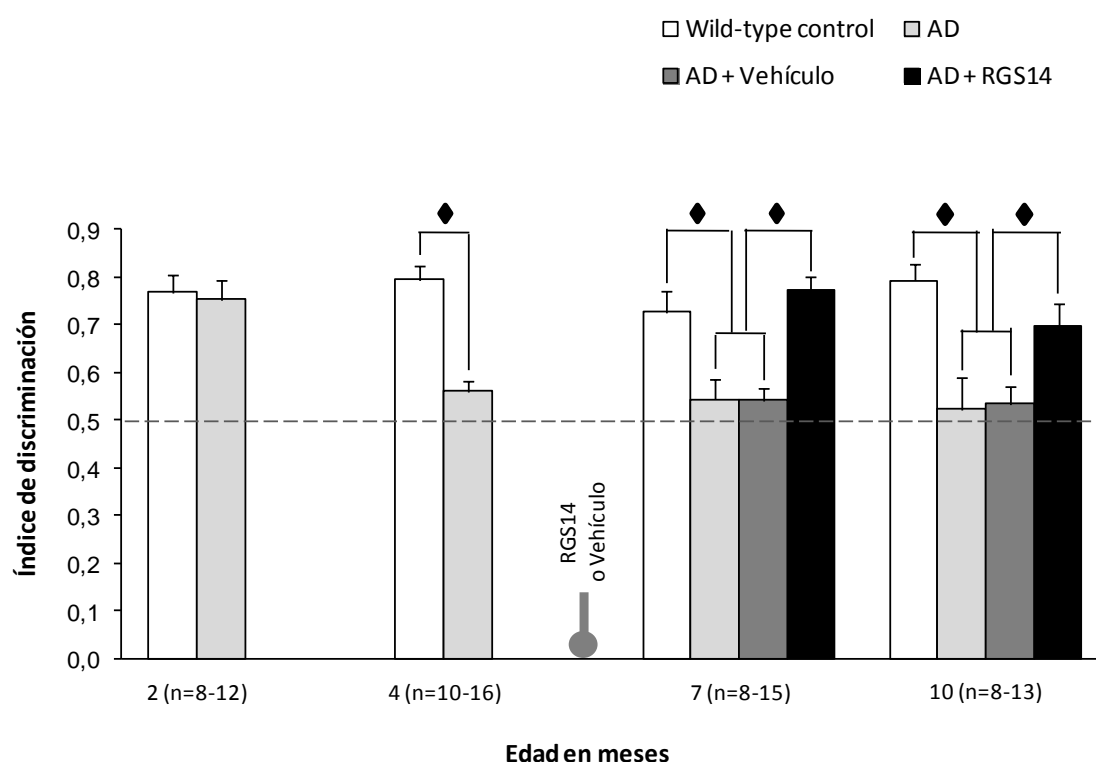


Figura 28. Recuperación de la pérdida de la ORM en un modelo de ratón con enfermedad de Alzheimer. Al igual que los ratones *Wild type* control, los ratones AD a los 2 meses de edad mostraban una ORM normal, sin embargo al alcanzar los 4 meses de edad estos ratones mostraban un déficit de la ORM a diferencia del grupo *Wild type* control. Un tratamiento localizado con el gen RGS14₄₁₄ en el área V2 en este modelo con déficit de memoria (AD, 4 meses) dio lugar a una recuperación de la ORM, la cual se mantenía incluso hasta los 10 meses de edad (7 y 10 meses). (n) indica el número de ratones utilizados en cada condición ♦ muestra diferencias significativas intergrupos ($p \leq 0,05$). AD: enfermedad de Alzheimer.

2 Mecanismo de la acción potenciadora de la proteína RGS14

Para determinar el posible mecanismo de acción de la proteína RGS14 sobre el procesamiento de la ORM, se emplearon distintos fármacos antagonistas o inhibidores (tabla 11, apartado III.2). Estos fármacos se administraron en ratas tratadas con el gen RGS14 a las que se les evaluó la ORM.

2.1 Implicación de los receptores AMPA/Kainato

En una primera fase se confirmó el efecto potenciador de RGS14 sobre la ORM tras realizar el test de ORM con un tiempo de demora de 24 h en animales de 3 meses de edad ($0,696 \pm 0,020$, grupo-RGS14 vs $0,522 \pm 0,020$, grupo-vehículo, prueba t de *Student* desapareada, $p = 0,002$). Sin embargo como se muestra en la figura 29, y tras realizar ANOVA de un factor seguido de una prueba post hoc de *Bonferroni*, se confirmó que este aumento de memoria se revertió mediante la administración de CNQX (antagonista de los receptores AMPA/Kainato) ($0,475 \pm 0,067$, $p < 0,001$), KN62 (inhibidor de la proteína quinasa II dependiente de Ca / Calmodulina (CaMKII)) ($0,567 \pm 0,027$, $p=0,002$) o TIQ-A (inhibidor de la Poly[ADP]-Ribosa polimerasa 1 (PARP-1) responsable de la ribosilación) ($0,498 \pm 0,031$, $p < 0,001$).

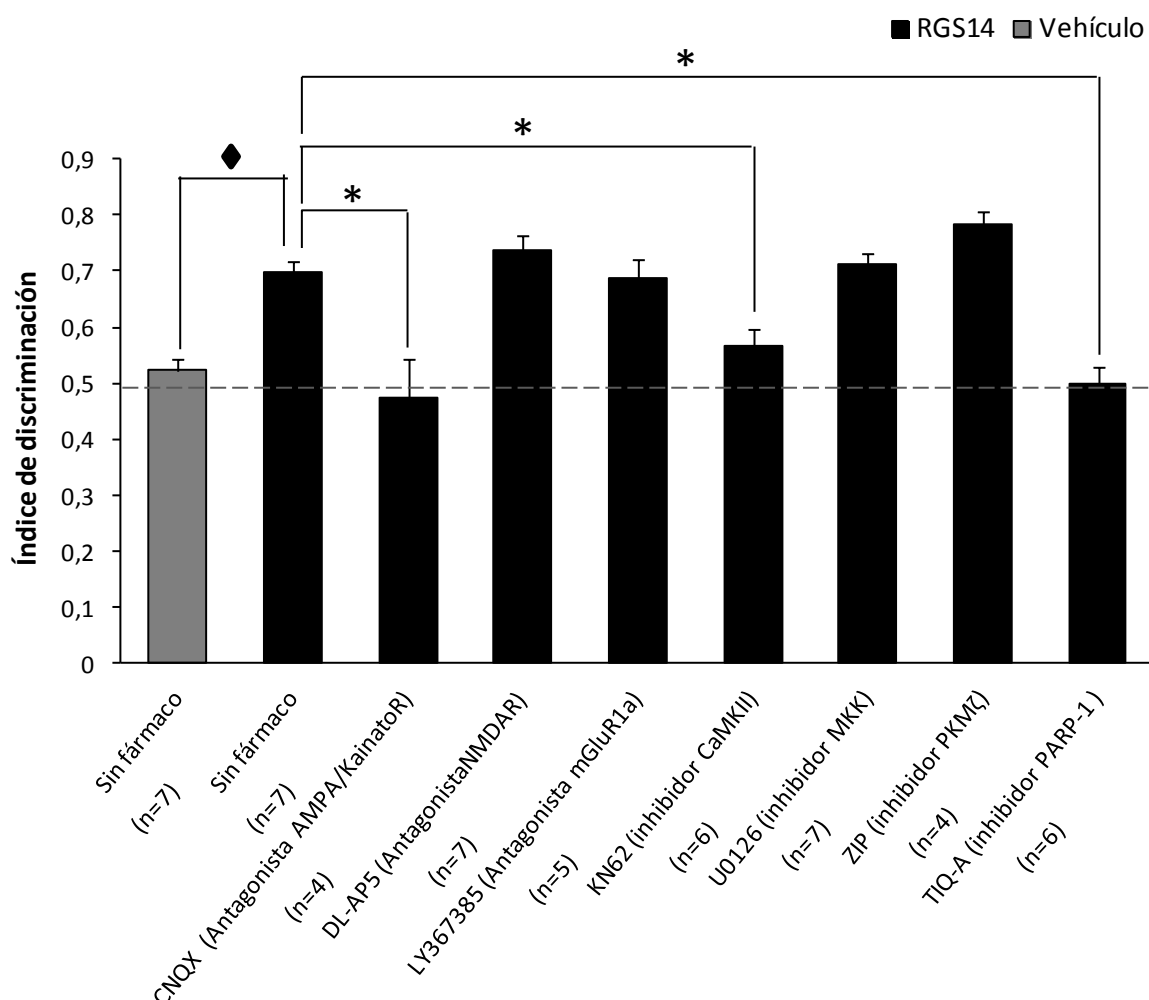


Figura 29. Los receptores AMPA/Kainato, CaMKII y PARP-1 están involucrados en la ORM mediada por RGS14. La administración de CNQX, KN62 o TIQ-A revirtió el efecto del aumento de memoria producido por el tratamiento con el gen RGS14₄₁₄, sin embargo, la administración de AP5, Ly367385, U0126 y ZIP no presentó ningún efecto. (n) indica el número de ratas en cada condición. * muestra diferencias significativas intra-grupos y ◆ muestra diferencias significativas intergrupos. ($p \leq 0,05$).

Por el contrario, la administración de DL-AP5 (antagonista de los receptores NMDA) ($0,736 \pm 0,025$, $p = 1$), LY367385 (antagonista del receptor metabotrópico de glutamato mGluR1a) ($0,685 \pm 0,025$, $p = 1$), U0126 (inhibidor de la MAP quinasa quinasa (MKK)) ($0,711 \pm 0,020$, $p = 1$) y ZIP (inhibidor de la proteína quinasa Mzeta (PKM ζ), $0,782 \pm 0,025$, $p = 0,832$) no presentó ningún efecto (figura 29).

2.2 Expresión dinámica de los receptores AMPA en animales-RGS

Ante la posible implicación de los receptores AMPA en el efecto de la proteína RGS14 en la potenciación de la ORM, puesta de manifiesto tras la administración del antagonista CNQX, se realizó el análisis génico de la familia de receptores AMPA GluR1-4 y el posterior análisis proteico de la subunidad GluR2.

2.2.1 Aumento en la expresión génica de GluR2 y GluR4.

La figura 30 muestra los resultados obtenidos tras el desarrollo del análisis génico de los receptores AMPA llevado a cabo mediante qRT-PCR, observándose un aumento significativo tanto en los niveles de mRNA del gen GluR2 ($66,3 \pm 6,250$ %; t de *Student* apareada $p = 0,006$) como del gen GluR4 ($23,3 \pm 3,1$ %; t de *Student* apareada $p < 0,001$), aunque en este último caso los cambios fueron menores. Sin embargo el tratamiento con RGS14 en el área V2 no produjo cambios significativos de los genes GluR1 ($10,0 \pm 5,6$ %; t de *Student* apareada $p = 0,163$) y GluR3 ($-3,7 \pm 1,8$ %; t de *Student* apareada $p = 0,189$).

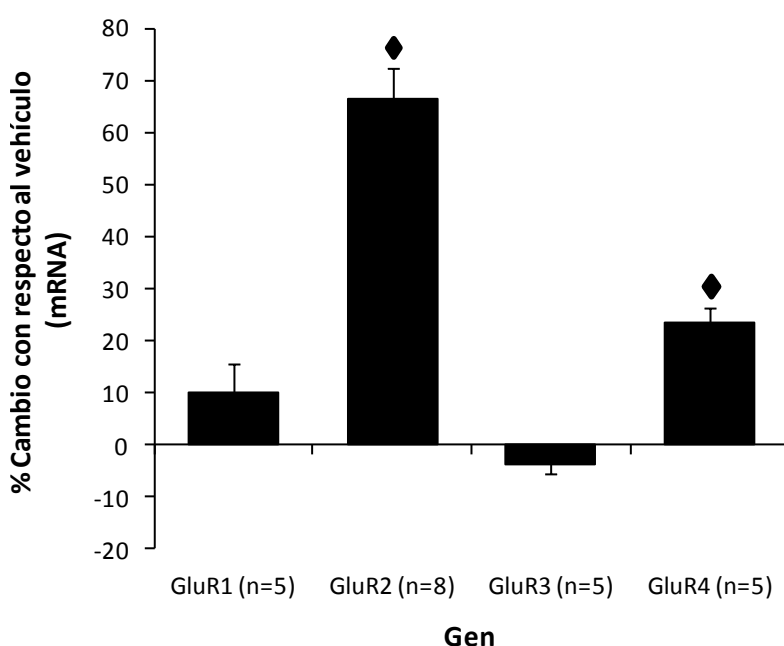


Figura 30. El tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ conlleva un aumento en la expresión de mRNA de los genes GluR2 y GluR4 en el área V2. El tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ produjo un aumento significativo en los niveles de mRNA del gen GluR2 (≈ 65 %) y del gen GluR4 (≈ 24 %). No obstante no se observaron diferencias en el caso de los genes GluR1 y GluR3. (n) indica el número de ratas utilizadas en cada condición. \blacklozenge muestra diferencias significativas intergrupos ($p \leq 0,05$).

2.2.2 Patrón de expresión proteica de GluR2 durante el procesamiento de la memoria de objetos.

La figura 31.A muestra la representación esquemática del diseño experimental para el estudio de la acción dinámica de la proteína GluR2. En la figura 31.B se presenta un ejemplo de un experimento de Western blot donde se observa la expresión de las proteínas GluR2 y GAPDH (control de carga) tras 20, 40, 60 min y 24 h desde la exposición a un objeto.

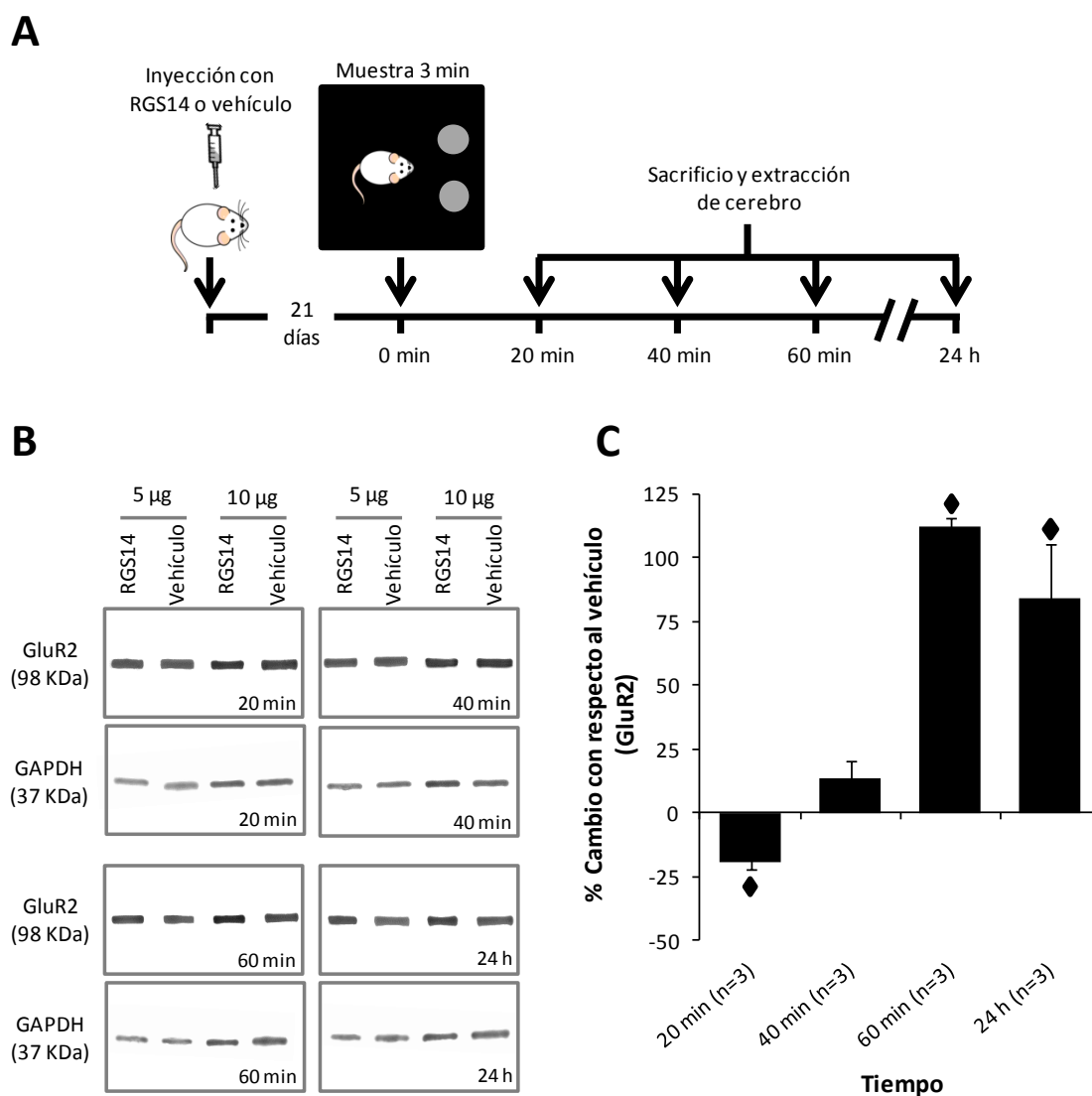


Figura 31. Acción dinámica de la proteína GluR2 durante el procesamiento de la ORM. (A) Representación esquemática del diseño experimental mostrando los diferentes momentos de extracción del área V2 para la realización de los experimentos de Western blot. (B) Un ejemplo de los resultados observados en Western blot donde se muestra la expresión de las proteínas GluR2 y GAPDH (control de carga) tras 20, 40, 60 min y 24 h desde la exposición a los objetos (C) Resumen de los resultados obtenidos por Western blot donde se muestra que el tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ causó una disminución significativa en los niveles de la proteína GluR2 tras 20 min desde la exposición a los objetos así como un incremento significativo tras 60 min y 24 h. (n) indica el número de ratas utilizadas en cada condición. ♦ muestra diferencias significativas intergrupos. ($p \leq 0,05$).

La figura 31.C muestra la expresión de la proteína GluR2 durante el procesamiento de la ORM en animales-RGS, observándose, una disminución significativa tras 20 min ($-19,6 \pm 2,9$ %; t de *Student* apareada $p = 0,036$) así como un incremento significativo a partir de 60 min ($112,3 \pm 2,9$ %; t de *Student* apareada $p = 0,013$) y tras 24 h ($84,1 \pm 21,4$ %; t de *Student* apareada $p = 0,025$). Por el contrario, no se obtuvieron diferencias significativas a los 40 min ($13,4 \pm 6,7$ %; t de *Student* apareada $p = 0,114$).

2.3 Correlación entre ORM y la plasticidad sináptica en la corteza perirrinal

Tras la demostración del efecto potenciador de RGS14 sobre la memoria episódica en el área V2, se planteó confirmar dicho efecto en la corteza perirrinal, una de las áreas cerebrales más estudiadas para delinear los correlatos electrofisiológicos del procesamiento de ORM (Brown & Aggleton 2001; Kim et al 2014; Lech & Suchan 2013; Martin et al 2013; Ranganath & Ritchey 2012; Warburton & Brown 2010; Watson & Lee 2013), con el objetivo de estudiar la correlación entre el efecto de RGS14 observado en los estudios comportamentales de la memoria y la plasticidad sináptica hebiana.

2.3.1 Aumento en la ORM mediado por RGS14₄₁₄ en la corteza perirrinal

Para ello se realizó el test de ORM con un tiempo de demora de 24 h (apartado III.1.2.4) en ratas de 3 meses de edad a las que se les administró lentivirus-RGS14 o lentivirus-vehículo en la corteza perirrinal.

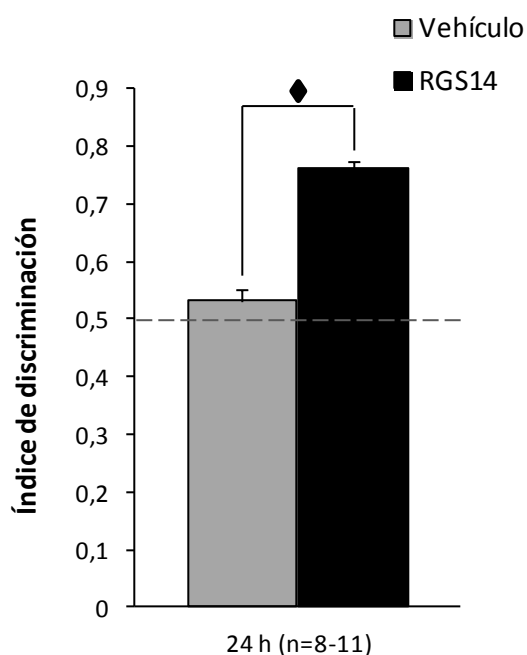


Figura 32 El tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ en la corteza perirrinal de ratas produce un aumento de la ORM, al igual que se observó anteriormente en el área V2. Mediante la realización de un test de ORM, se muestra que el grupo de animales tratados con vehículo fue incapaz de reconocer un objeto tras 24 h desde la exposición, sin embargo el grupo de ratas tratadas con RGS fue capaz de reconocerlo y por tanto de retener en la memoria la información de dicho objeto. (n) indica el número de ratas utilizadas en cada condición. ♦ muestra diferencias significativas intergrupos. ($p \leq 0,05$).

Como muestran los valores de DI en la figura 32, a diferencia del grupo de animales vehículo ($0,531 \pm 0,018$), el grupo-RGS14 fue capaz de retener la información de objetos ($0,763 \pm 0,010$; prueba t de *Student* desapareada, $p < 0,001$).

2.3.2 Estudio de la plasticidad sináptica

Una vez comprobado el efecto potenciador de RGS14 sobre la ORM en la corteza perirrinal, se propuso estudiar si el tratamiento con el gen RGS14 producía cambios en la plasticidad sináptica hebbiana, realizando registros extracelulares *in vitro* de potenciales de campo en rodajas de cerebro de rata que contenían la corteza perirrinal y empleando para ello diferentes protocolos de estimulación para la inducción de: (i) potenciación a largo plazo (LTP), (ii) depresión a largo plazo (LTD) dependiente de receptores colinérgicos muscarínicos y por último (iii) despotenciación.

2.3.2.1 Efecto de RGS14₄₁₄ sobre la LTP inducida por estimulación de alta frecuencia (HFS)

En la figura 33 se representan los valores normalizados de la amplitud del \overline{fEPSP} como media \pm SEM (apartado III.4.2.1.3) obtenidos al inducir una LTP en la corteza perirrinal mediante dos protocolos distintos de estimulación de alta frecuencia (HFS): (i) 4 trenes de estímulos de 1 s de duración a 100 Hz con un periodo de 30 s entre cada tren (figura 33.A) y (ii) un tren de estímulos de 1 s de duración a 20 Hz (figura 33.B).

Una prueba t de *Student* apareada comparando la línea base con respecto a la LTP producida muestra cómo se originó una LTP inducida por HFS a 100 Hz tanto en el grupo-control ($p < 0,001$) como en el grupo-RGS14 ($p = 0,003$), tal y como se puede observar en los registros extracelulares *in vitro* de potenciales de campo obtenidos (figura 33.A). Sin embargo, en el grupo-RGS14 no se originó una LTP inducida por HFS a 20 Hz ($p = 0,764$) a diferencia del grupo-control, donde sí se produjo ($p = 0,024$) (figura 33.B).

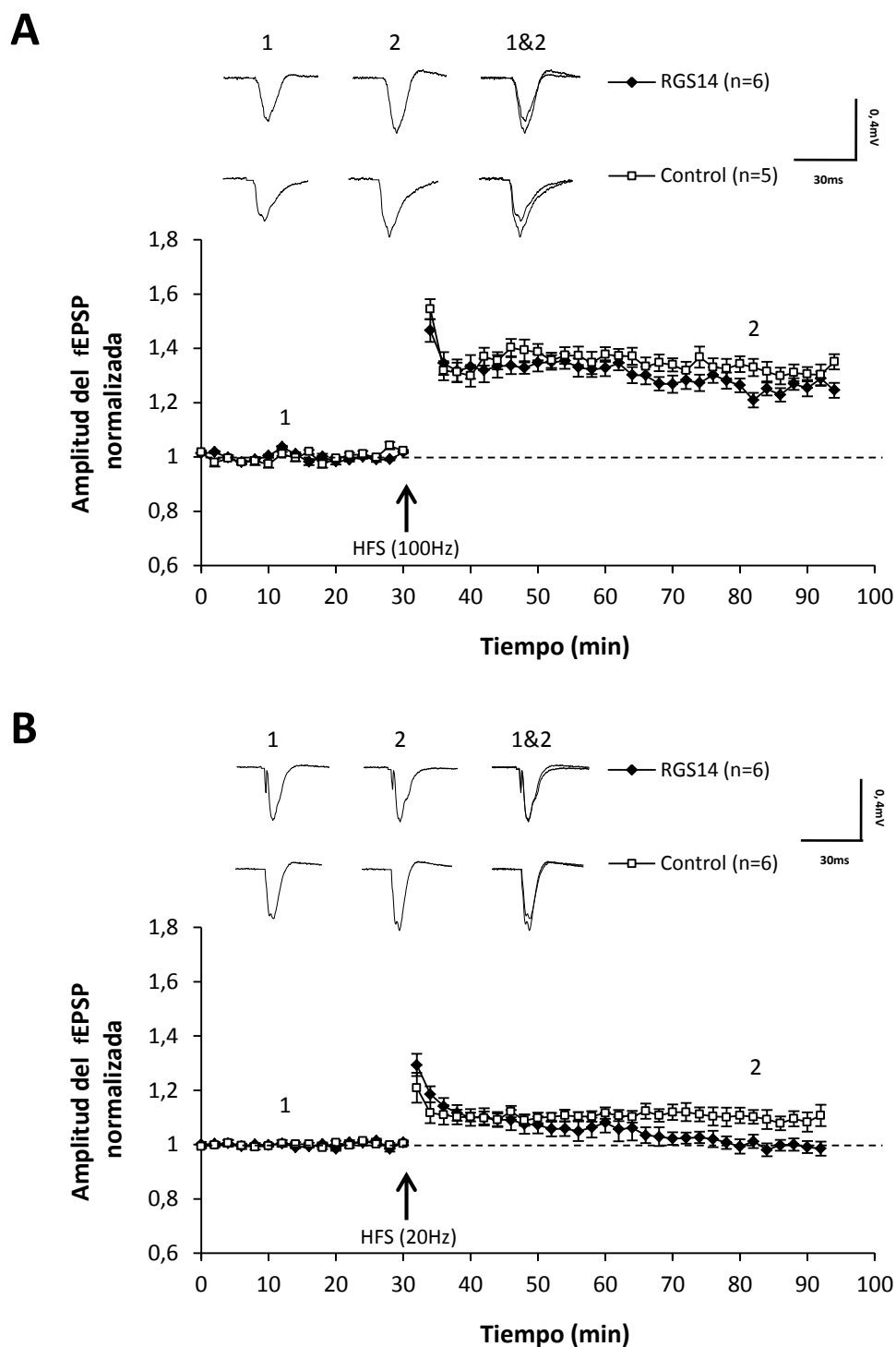


Figura 33. Alteración en la LTP inducida por 20 Hz pero no por 100 Hz en la corteza perirrinal de ratas-RGS. (A) Los registros extracelulares *in vitro* de potenciales de campo muestran que no existen diferencias en la magnitud de la LTP inducida por HFS a 100 Hz (4 trenes de 1 s de duración; indicado con una flecha) entre el grupo tratado con RGS14 ($n = 6$, $p = 0,003$) y el grupo-control no tratado ($n = 5$, $p < 0,001$). (B) Sin embargo, la LTP inducida por HFS a 20 Hz (1 tren de 1 s de duración; indicado con una flecha) dio lugar a una caída en el mantenimiento de la LTP en el grupo-RGS14 ($n = 6$, $p = 0,764$) a diferencia del grupo-control ($n = 6$, $p = 0,024$). Los trazos que se muestran encima de las gráficas A y B representan fEPSPs tomados en los puntos de tiempo indicados con 1 y 2. Cada trazo representa la media de cuatro fEPSPs y el artefacto del estímulo se eliminó para la presentación. El número de ratas (n) se indica en la leyenda.

2.3.2.2 Efecto de RGS14 sobre la LTD inducida por estimulación del sistema colinérgico muscarínico

Los valores normalizados de la amplitud del fEPSP, representados en la figura 34 como media \pm SEM (apartado III.4.2.1.3), se obtuvieron tras inducir una LTD en la corteza perirrinial dependiente de receptores colinérgicos muscarínicos con la aplicación durante 10 min de carbacol (agonista del sistema colinérgico muscarínico) a dos concentraciones distintas: (i) 50 μ M (figura 34.A) y (ii) 20 μ M (figura 34.B).

Los registros extracelulares *in vitro* de potenciales de campo (figura 34) muestran que se produjo una LTD inducida por 50 μ M de carbacol tanto en el grupo-control (prueba t de *Student* apareada, $p < 0,001$) como en el grupo-RGS14 (prueba t de *Student* apareada, $p = 0,004$) siendo esta LTD similar en ambos grupos. Sin embargo, al igual que ocurría en el caso de la LTP, al provocar una estimulación menor, no se originó una LTD inducida por 20 μ M de carbacol en el caso del grupo-RGS14 (prueba t de *Student* apareada, $p = 0,056$) a diferencia del grupo-control donde sí se produjo (prueba t de *Student* apareada, $p = 0,006$).

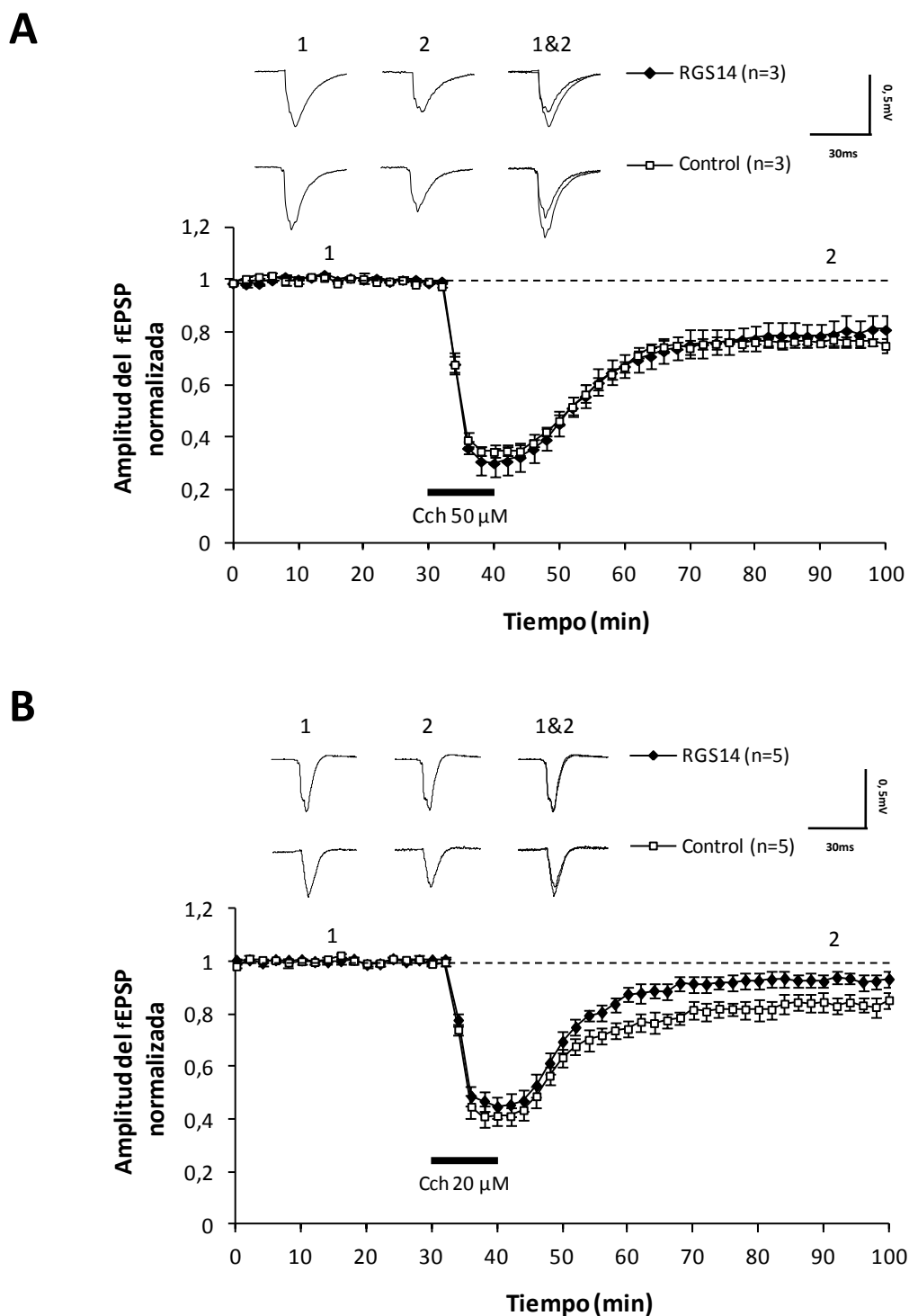


Figura 34. Alteración de la LTD inducida por la aplicación de carbacol a 20 μ M y no 50 μ M en la corteza perirrinal de ratas-RGS. (A) Los registros extracelulares *in vitro* de potenciales de campo muestran que la aplicación de carbacol (CCh) a una concentración de 50 μ M durante 10 min (indicada con una barra gruesa negra) produjo una fuerte depresión seguida de una LTD en el grupo-RGS14 ($n = 3$, $p = 0,004$) al igual que en el grupo-control ($n = 3$, $p < 0,001$). (B) Sin embargo, al utilizarlo a una concentración de 20 μ M durante 10 min (indicada con una barra gruesa negra), se observó una caída en el mantenimiento de la LTD en el grupo-RGS14 ($n = 5$, $p = 0,056$) a diferencia del grupo-control ($n = 6$, $p = 0,006$). Los trazos que se muestran encima de las gráficas A y B representan fEPSPs tomados en los puntos de tiempo indicados con 1 y 2. Cada trazo representa la media de cuatro fEPSPs y el artefacto del estímulo se eliminó para la presentación. El número de ratas (n) se indica en la leyenda.

2.3.2.3 Efecto de RGS14 en la producción de despotenciación inducida por estimulación de baja frecuencia (LFS)

En la figura 35 se representan los registros extracelulares *in vitro* de potenciales de campo obtenidos tras inducir una despotenciación en la corteza perirrinial mediante un protocolo de estimulación de baja frecuencia (LFS) (900 estímulos a 1 Hz durante 15 min) 20 min después de inducir la LTP (HFS, 4 trenes de 1 s de duración a 100 Hz con un periodo de 30 s entre cada tren).

Un ANOVA de un factor con medidas repetidas seguido de una prueba post hoc de *Bonferroni*, que contrasta la línea base frente la LTP o la despotenciación en cada uno de los grupos, muestra que tal y como era de esperar, se produjo una LTP en ambos grupos ($p < 0,001$); mientras que la despotenciación inducida a 1 Hz no se originó en el grupo-RGS14 ($p = 0,565$), a diferencia del grupo-control ($p = 0,002$) donde sí se produjo. Una prueba t de *Student* desapareada confirmó que efectivamente existían diferencias significativas en la despotenciación entre el grupo-control y el grupo-RGS14 ($p = 0,034$).

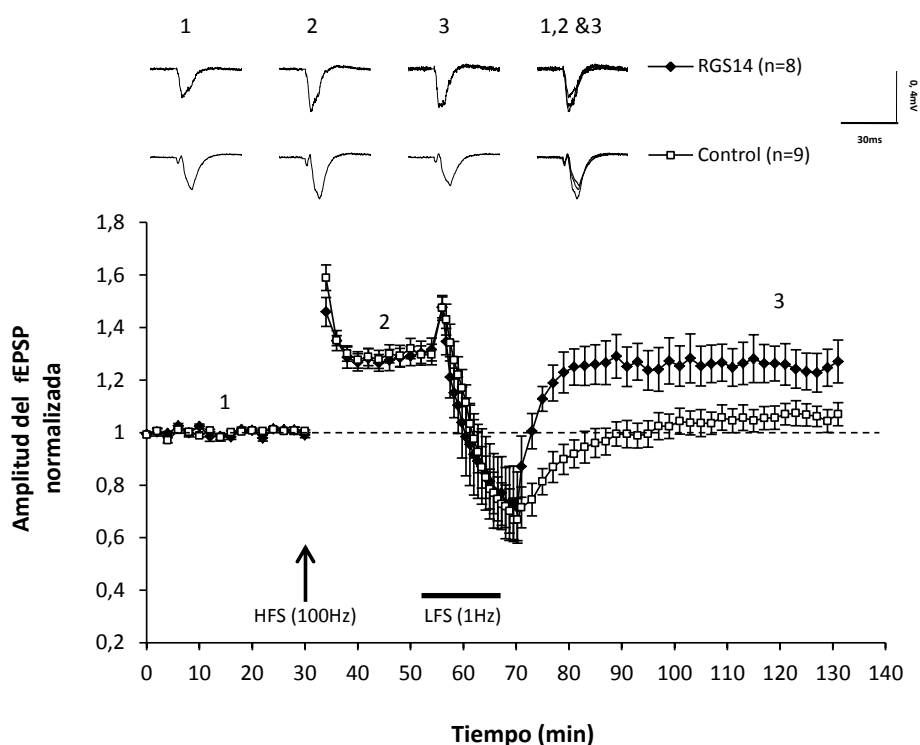
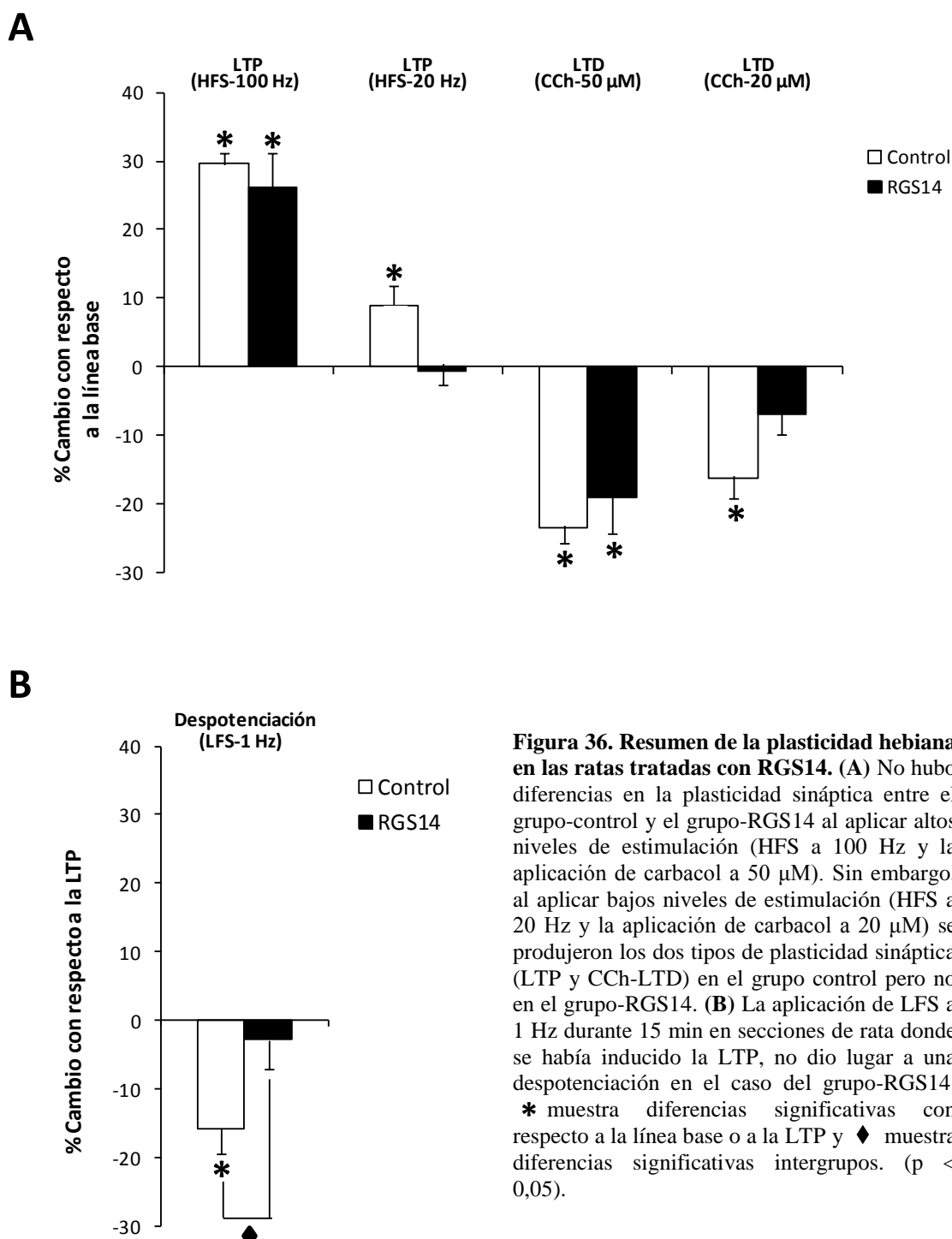


Figura 35. Fallo en la producción de despotenciación en la corteza perirrinial de ratas-RGS. Los registros extracelulares *in vitro* de potenciales de campo muestran cómo después de inducir la LTP (4 trenes de 1 s de duración a 100 Hz, indicado con una flecha), se produjo la despotenciación mediante la aplicación de una estimulación a 1 Hz durante 15 min (indicada con una barra gruesa negra). Esta despotenciación no se originó en el caso de las ratas tratadas con RGS ($n = 8$, $p = 0,565$). Los trazos que se muestran encima de la gráfica representan fEPSPs tomados en los puntos de tiempo indicados con 1, 2 y 3. Cada trazo representa la media de cuatro fEPSPs y el artefacto del estímulo se eliminó para la presentación. El número de ratas (n) se indica en la leyenda.

2.3.2.4 Resumen del efecto de RGS14 sobre la plasticidad hebiana en corteza perirrinal



En la figura 36 se muestra un resumen de la plasticidad sináptica (LTP, LTD dependiente de receptores colinérgicos muscarínicos y despotenciación) en la corteza perirrinal tanto en el grupo-RGS14, como en el grupo-control. Se representan los porcentajes de cambio de los valores normalizados de la amplitud del fEPSP (A fEPSP_{nor}) de los grupos RGS14 y control con respecto a la línea base, en el caso de la inducción de LTP y LTD (figura 36.A), o con

respecto al LTP, en el caso de la inducción de la despoteñación (figura 36.B). Estos porcentajes de cambio se calcularon de la siguiente manera:

$$\frac{A fEPSP_{nor(\text{control } \acute{o} \text{ RGS14})}(\text{LTP, LTD, Desp.}) - A fEPSP_{nor(\text{control } \acute{o} \text{ RGS14})}(\text{línea base } \acute{o} \text{ LTP})}{A fEPSP_{nor(\text{control } \acute{o} \text{ RGS14})}(\text{línea base } \acute{o} \text{ LTP})} \times 100$$

En la figura 36.A se observa cómo altos niveles de estimulación (HFS a 100 Hz y la aplicación de carbacol a 50 μM) dieron lugar a LTP y LTD respectivamente tanto en el grupo-RGS14 (LTP, $26,271 \pm 4,925$ % y LTD, $-19,022 \pm 5,276$ %) como en el grupo-control (LTP, $29,780 \pm 1,451$ % y LTD, $-23,545 \pm 2,242$ %); sin embargo, bajos niveles de estimulación (HFS a 20 Hz y la aplicación de carbacol a 20 μM) no produjeron ni LTP ni LTD en el grupo-RGS14 (LTP, $-0,697 \pm 2,008$ % y LTD, $-7,012 \pm 2,785$ %), a diferencia del grupo-control donde sí se originaron (LTP, $8,906 \pm 3,027$ % y LTD, $-16,221 \pm 2,92$ %). Por otro lado, la figura 36.B muestra cómo la aplicación de LFS a 1 Hz durante 15 min en secciones de rata donde se había inducido la LTP, no dio lugar a una despoteñación en el caso del grupo-RGS14 ($-2,868 \pm 4,298$ %) a diferencia del grupo-control ($-15,769 \pm 3,570$ %) donde sí se produjo.

3 Áreas independientes del cerebro implicadas en el procesamiento de la memoria de reconocimiento de objetos

Se conoce que, además del área V2 y la corteza perirrinal, la corteza frontal desempeña un papel en el procesamiento de la memoria de objetos (Banks et al 2012; Swick & Knight 1999; Warburton & Brown 2010). Por lo tanto, se propuso estudiar la interrelación entre estas 3 áreas y se planteó demostrar tanto su implicación en la mejora del procesamiento de la ORM en ratas tratadas con RGS14 (utilizando como herramienta el test de ORM) como su posible independencia en dicho proceso.

3.1 Efecto potenciador de RGS14 sobre la ORM en las áreas V2, perirrinal y frontal

Como muestra la figura 37, a diferencia de sus respectivos grupos-vehículo, los grupos de ratas-RGS14 tratadas en las áreas V2, perirrinal y frontal fueron capaces de retener la información de objetos tras un tiempo de demora de 24 h, confirmándose el efecto potenciador de RGS14 sobre la ORM demostrado anteriormente.

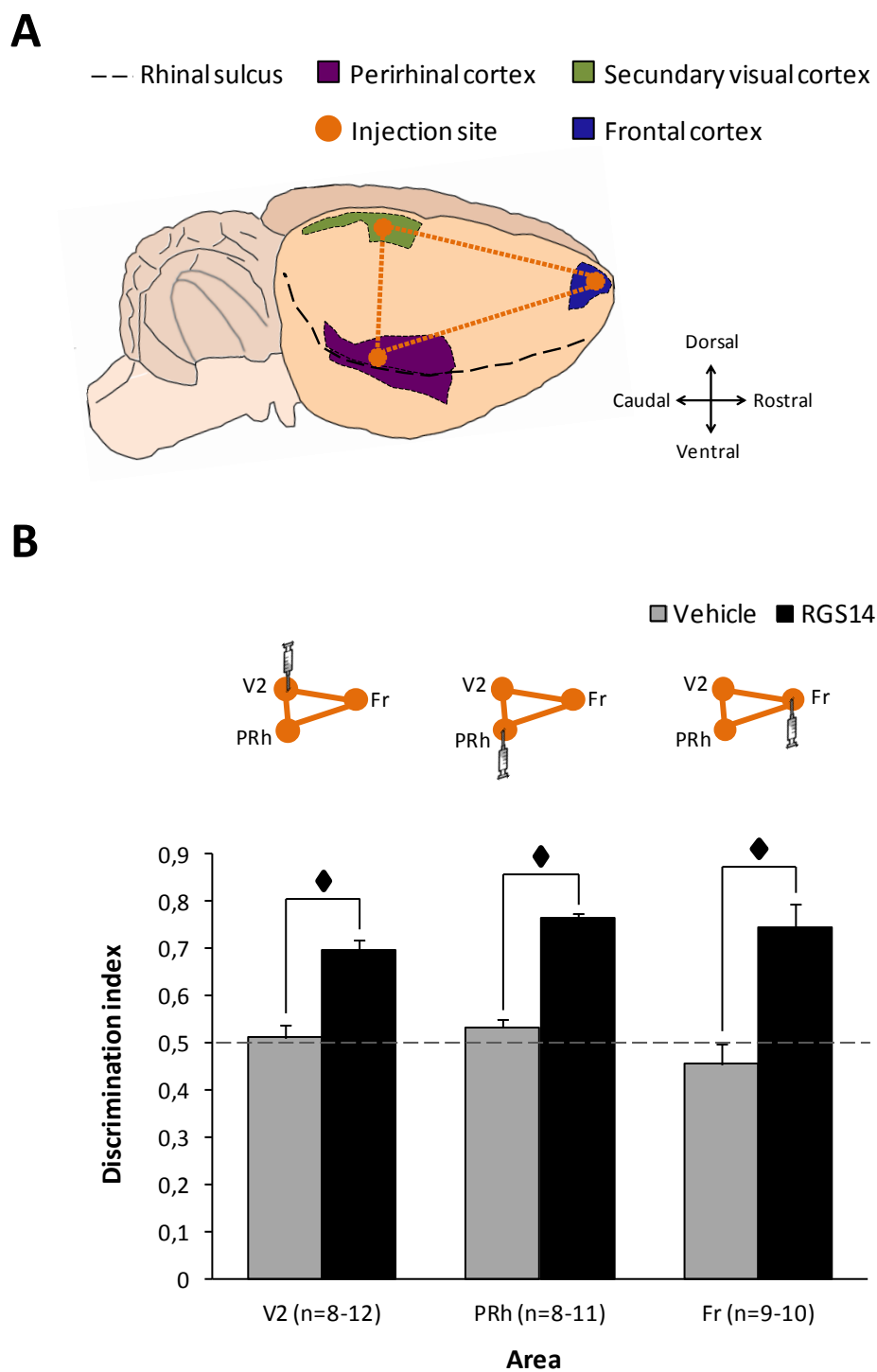


Figura 37. El tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ en el área V2 y las cortezas perirrinal y frontal produce un aumento de la ORM. (A) Representación esquemática de una vista lateral de un cerebro de rata donde se muestran los sitios de inyección: corteza perirrinal (PRh), corteza frontal (Fr) y el área V2 (V2). (B) El tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ tanto en el área V2, PRh o Fr, produjo un aumento notable en la ORM. Este aumento de memoria fue similar a lo observado anteriormente en el área V2. Las jeringas representadas en el esquema en la parte superior de la gráfica B, indican los lugares tratados con el gen RGS14 o vehículo y los resultados correspondientes se muestran justo debajo en el gráfico de barras. (n) número de ratas utilizadas en cada situación. ♦ muestra diferencias significativas intergrupos. ($p \leq 0,05$).

Mediante un análisis estadístico con una prueba de t de *Student* desapareada se observaron diferencias significativas entre el grupo-RGS14 y el grupo-control tanto en el caso del tratamiento en el área V2 ($0,696 \pm 0,020$, grupo-RGS14 vs $0,515 \pm 0,025$, grupo- vehículo; $p < 0,001$), como en las cortezas perirrinal ($0,763 \pm 0,012$, grupo-RGS14 vs $0,531 \pm 0,018$, grupo-vehículo; $p < 0,001$) y frontal ($0,745 \pm 0,048$, grupo-RGS14 vs $0,454 \pm 0,043$, grupo-vehículo; $p < 0,001$).

3.2 Dominios cerebrales independientes en el procesamiento de la ORM

Tras la determinación de la implicación de las áreas V2, perirrinal y frontal en el procesamiento de la ORM en animales RGS, se planteó comprobar la hipótesis de la implicación de estas áreas de forma independiente en el procesamiento de la ORM. En este estudio se utilizó la inmunotoxina Ox7-SAP como herramienta para eliminar las neuronas selectivamente en las áreas de interés (figura 38).

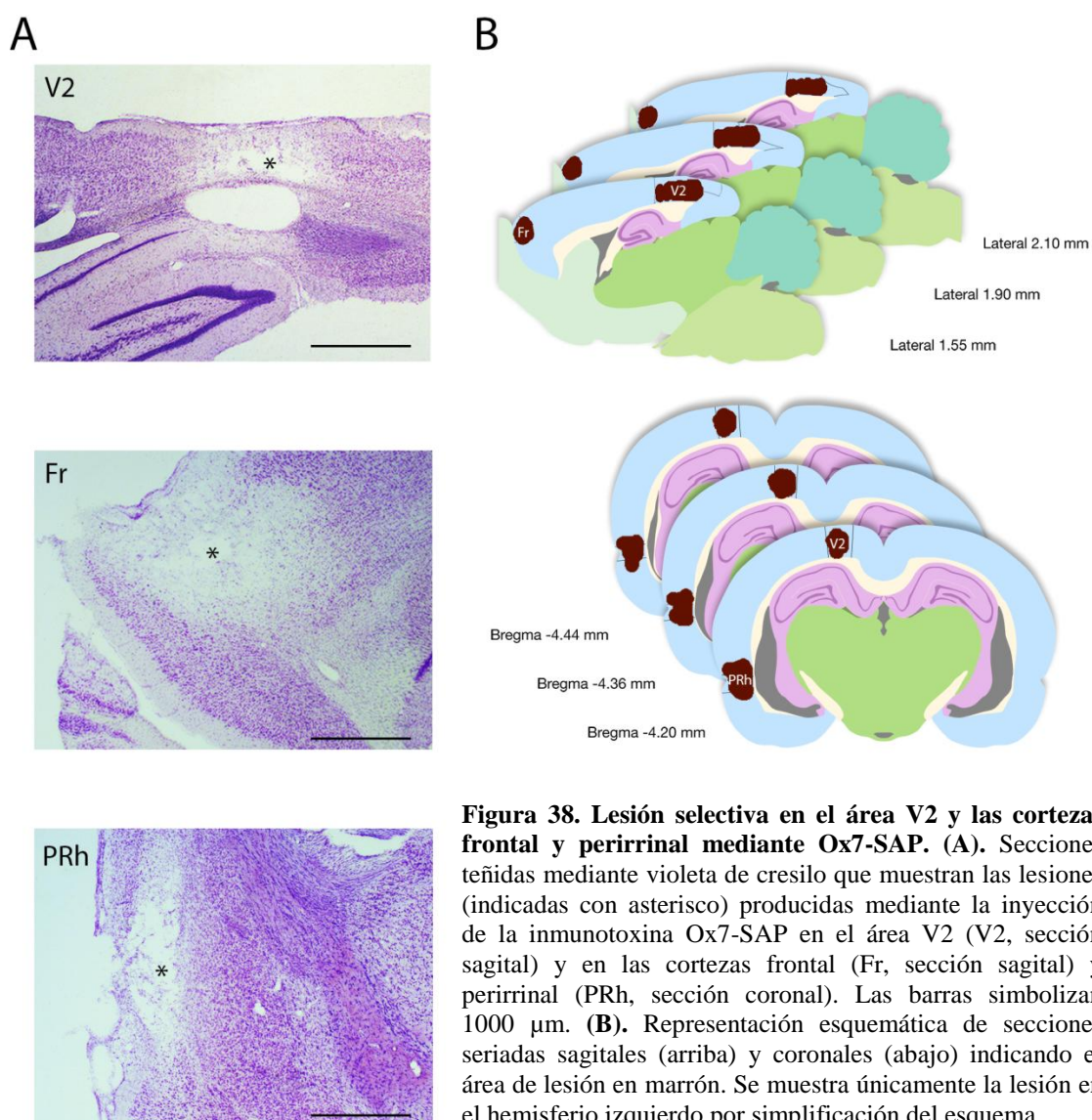


Figura 38. Lesión selectiva en el área V2 y las cortezas frontal y perirrinal mediante Ox7-SAP. (A). Secciones teñidas mediante violeta de cresilo que muestran las lesiones (indicadas con asterisco) producidas mediante la inyección de la inmunotoxina Ox7-SAP en el área V2 (V2, sección sagital) y en las cortezas frontal (Fr, sección sagital) y perirrinal (PRh, sección coronal). Las barras simbolizan 1000 μm . **(B).** Representación esquemática de secciones seriadas sagitales (arriba) y coroneales (abajo) indicando el área de lesión en marrón. Se muestra únicamente la lesión en el hemisferio izquierdo por simplificación del esquema.

3.2.1 Independencia del área V2 en la ORM

En la figura 39 se observan los resultados de las pruebas de ORM tras un tiempo de demora de 24 h, en ratas tratadas con el gen RGS14 o vehículo en el área V2 y tras la eliminación de las neuronas en las áreas de interés, V2, perirrinal y/o frontal, con Ox7-SAP. Después de confirmar el efecto potenciador de RGS14 en el área V2 (grupo-RGS14 $0,696 \pm 0,020$ vs grupo-vehículo $0,510 \pm 0,024$; prueba t de *Student* desapareada, $p < 0,001$), la eliminación de las neuronas del área V2 mediante el tratamiento con Ox7-SAP, abolió este efecto ($0,517 \pm 0,026$, $p < 0,001$).

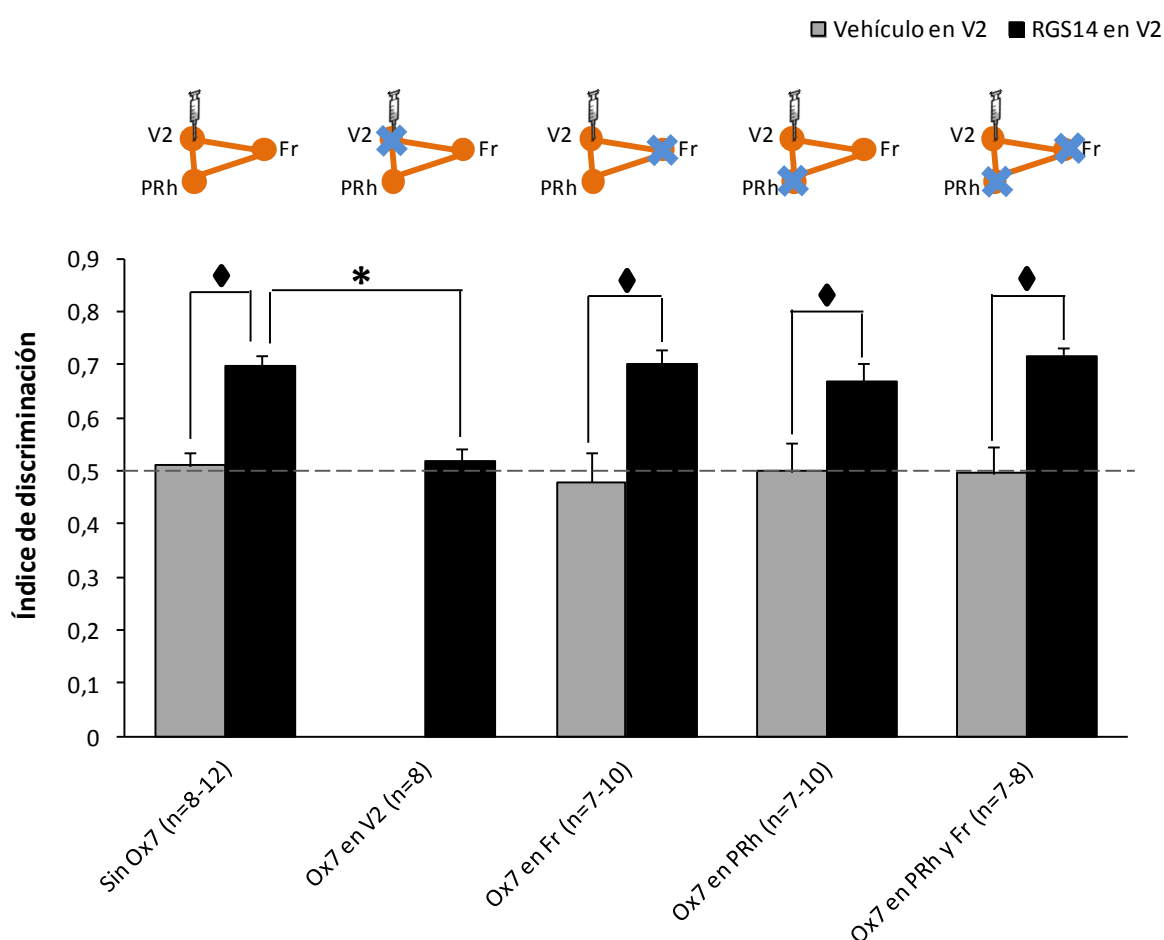


Figura 39. El aumento de la ORM mediante el tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ en el área V2 es independiente de las cortezas perirrinal y frontal. La eliminación selectiva de las neuronas del área V2 mediante el tratamiento con Ox7 revirtió totalmente el aumento de la ORM producido tras la activación de las neuronas de dicha área (Barras “Sin Ox7 y Ox7 en V2”). Este aumento de memoria tras el tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ en el área V2, no se vio afectado cuando Ox7 se aplicó en la corteza perirrinal (PRh) y/o la corteza frontal (Fr). Las jeringas que se muestran en el esquema de la parte superior de la gráfica indican los sitios del tratamiento con el gen RGS14 o vehículo y las cruces indican los sitios del tratamiento con Ox7 en cada caso. Los resultados correspondientes a la aplicación de los tratamientos se exponen justo por debajo de ellos en el gráfico de barras. (n) número de animales en cada situación. * muestra diferencias significativas intra-grupos y ♦ muestra diferencias significativas intergrupos. ($p \leq 0,05$).

Por el contrario, la eliminación de las neuronas de la corteza frontal ($0,702 \pm 0,026$) o perirrinal ($0,668 \pm 0,033$), así como las de ambas ($0,715 \pm 0,016$), no afectó al efecto potenciador de RGS14 en el área V2 sobre la ORM ($p \leq 0,05$) con respecto a sus grupos vehículo (Ox7-Fr $0,478 \pm 0,055$; Ox7-PRh $0,499 \pm 0,053$; Ox7-PRh y Fr $0,495 \pm 0,051$).

3.2.2 Independencia de la corteza perirrinal en la ORM

Al igual que en el área V2, después de confirmar el efecto potenciador de RGS14 en la corteza perirrinal (grupo-RGS14 $0,760 \pm 0,011$ vs grupo-vehículo $0,531 \pm 0,018$; prueba t de Student desapareada, $p < 0,001$), la eliminación selectiva de las neuronas de esta área con la administración de Ox7-SAP abolió el efecto ($0,480 \pm 0,025$, $p < 0,001$) (figura 40).

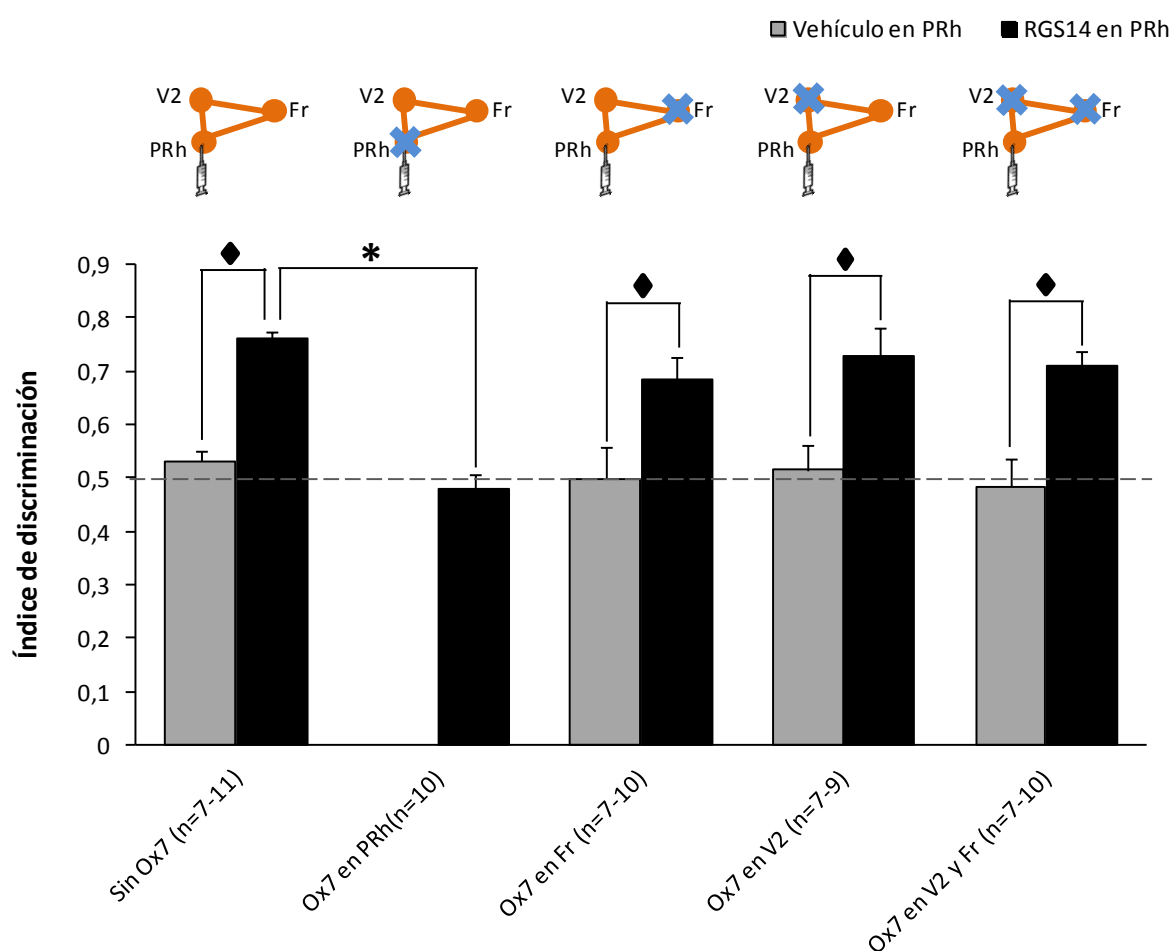


Figura 40. El aumento de la ORM mediante el tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ en la corteza perirrinal es independiente del área V2 y la corteza frontal. Al igual que lo ocurrido en el área V2, el tratamiento con Ox7 revirtió totalmente el aumento de la ORM producido mediante el tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ en la corteza perirrinal. Sin embargo, el tratamiento con Ox7 no mostró ningún efecto cuando este se administró en el área V2 (V2) y/o la corteza frontal (Fr). Las jeringas que se muestran en el esquema en la parte superior de la gráfica indican los sitios del tratamiento con el gen RGS14 o vehículo y las cruces indican los sitios del tratamiento con Ox7 en cada caso. Los resultados correspondientes a la aplicación de los tratamientos se exponen justo por debajo de ellos en el gráfico de barras. (n) número de animales en cada situación. * muestra diferencias significativas intra-grupos y ◆ muestra diferencias significativas intergrupos. ($p \leq 0,05$).

Sin embargo, en las ratas donde se eliminó el área V2 ($0,728 \pm 0,051$), corteza frontal ($0,682 \pm 0,045$) y ambas áreas ($0,708 \pm 0,028$), se mantuvo el efecto potenciador de RGS14, mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto a sus grupos vehículo (Ox7-Fr $0,498 \pm 0,058$; Ox7-V2 $0,515 \pm 0,046$; Ox7-Fr y V2 $0,483 \pm 0,054$).

3.2.3 Independencia de la corteza frontal en la ORM

Una vez confirmado el efecto potenciador del tratamiento con el gen RGS14 en la corteza frontal (grupo-RGS14 $0,745 \pm 0,048$ vs grupo-vehículo $0,450 \pm 0,040$; $p < 0,001$), la eliminación selectiva de las neuronas de la corteza frontal implicadas en el aumento de la ORM mediante Ox7-SAP también neutralizó el efecto potenciador ($0,479 \pm 0,022$, $p < 0,001$) (figura 41).

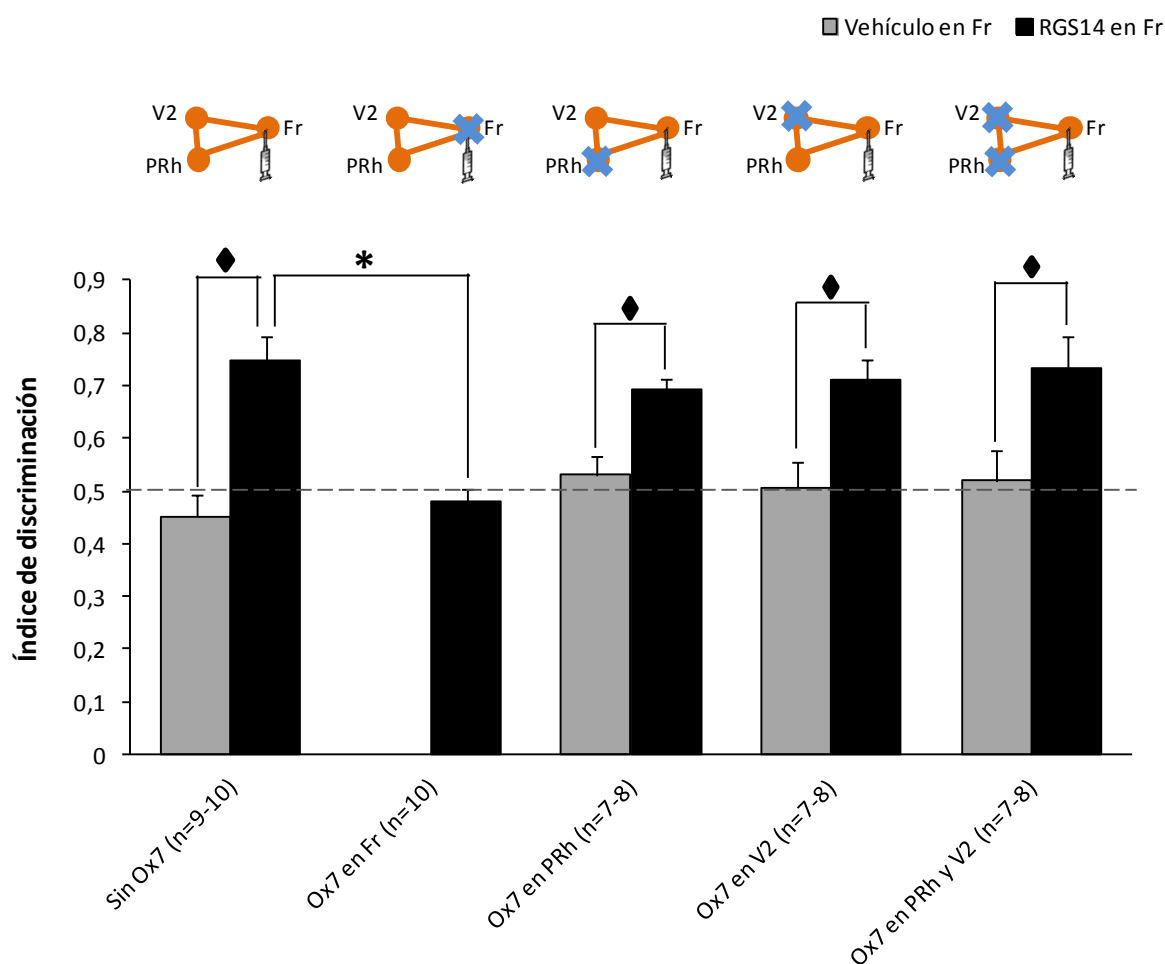


Figura 41. El aumento de la ORM mediante el tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ en la corteza frontal es independiente del área V2 y la corteza perirrinal. El aumento de la ORM asociado al tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ en la corteza frontal se revertió totalmente al administrar Ox7 en la misma área. Sin embargo, el tratamiento con Ox7 no mostró ningún efecto en el aumento de la ORM cuando este se administró en el área V2 (V2) y/o la corteza perirrinal (PRh). Las jeringas que se muestran en el esquema en la parte superior de la gráfica indican los sitios del tratamiento con el gen RGS14 o vehículo y las cruces indican los sitios del tratamiento con Ox7 en cada caso. Los resultados correspondientes a la aplicación de los tratamientos se exponen justo por debajo de ellos en el gráfico de barras. (n) número de animales en cada situación. * muestra diferencias significativas intra-grupos y ♦ muestra diferencias significativas intergrupos. ($p \leq 0,05$).

Por el contrario, la supresión de la acción de las neuronas de la corteza perirrinal ($0,693 \pm 0,020$), el área V2 ($0,710 \pm 0,038$) o ambas áreas ($0,731 \pm 0,061$) no afectó la retención de la información, existiendo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto a sus grupos vehículo (Ox7-PRh: $0,530 \pm 0,035$; Ox7-V2: $0,507 \pm 0,048$; Ox7-PRh y V2: $0,520 \pm 0,055$).

V. Discusión

Hasta el momento, la continua búsqueda de un tratamiento frente a la pérdida de memoria en muchas enfermedades neurodegenerativas no ha tenido éxito, y se espera que la población envejecida (de más de 65 años de edad) alcance alrededor del 35 % de la población total en 2-3 décadas en los países desarrollados. Existe una necesidad cada vez mayor de encontrar un tratamiento efectivo frente a estas enfermedades mentales para frenar la inmensa carga económica y social prevista que están por venir. Sin embargo, el enorme progreso que se ha producido durante las últimas décadas para elucidar los mecanismos implicados en la formación de las memorias a largo plazo ha proporcionado un gran conocimiento sobre cómo la memoria podría potenciarse (consultar Lee & Silva 2009; Stern & Alberini 2013). Por tanto, en el estudio de la potenciación de la memoria reside la clave para el desarrollo de estrategias encaminadas al tratamiento del deterioro de la memoria y la cognición. Con el objetivo de encontrar un tratamiento eficaz, nuestro laboratorio descubrió un potenciador de la memoria llamado RGS14₄₁₄. La sobreexpresión de la proteína RGS14₄₁₄ en el área V2 de la corteza visual secundaria promovió la conversión de la ORM a corto plazo, la cual persistía hasta los 45 min, en una memoria a largo plazo que podía trazarse incluso tras varios meses (Lopez-Aranda et al 2009). Además, este tratamiento triplicó la capacidad de retener la información de varios objetos en la memoria y el efecto tras un tratamiento único con RGS14₄₁₄ persistió a lo largo de toda la vida de las ratas (Navarro-Lobato 2015). Por tanto nos propusimos evaluar el efecto potenciador del tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ en la recuperación de la pérdida de la memoria en modelos de roedores con la idea de validar el potencial de la terapia con el gen RGS14₄₁₄ frente a la pérdida de la memoria. Además, nos planteamos elucidar las distintas causas implicadas en la potenciación de la memoria mediada por RGS.

1 Recuperación de la pérdida de una memoria episódica en envejecimiento y AD

Considerando que la pérdida de memoria episódica está principalmente afectada en el envejecimiento y en una gran variedad de enfermedades cerebrales, y que la ORM es uno de los ejemplos de memoria episódica más estudiados, decidimos trabajar con la ORM como indicador de memoria episódica. Para demostrar el efecto de RGS14₄₁₄ en la recuperación de la pérdida de la ORM, empleamos dos modelos que manifestaban déficit de memoria: envejecimiento normal y AD, en los cuales el deterioro de memoria episódica ha sido

ampliamente demostrado (Didic et al 2011; Drag & Bieliauskas 2010; Dubois et al 2007; Gallagher & Koh 2011; Kitazawa et al 2012; Nyberg et al 2012; Salmon 2012; Shing et al 2010). Observamos como ratas controles con 3 meses de edad eran capaces de retener la información de objetos tras 45 min. Sin embargo estas mismas ratas, al alcanzar los 18 meses, fueron incapaces de recordar la misma información. Al tratar las ratas de 18 meses con déficit de memoria con el gen RGS14₄₁₄, se produjo una completa recuperación de la pérdida de la ORM en los mismos. Por otro lado, ratones de dos meses transgénicos AD mostraron un nivel normal de ORM el cual era similar al de los ratones *wild type* control, sin embargo a los 4 meses estos ratones mostraron un déficit de ORM. Al igual que lo que ocurría en el caso de las ratas envejecidas, el tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ de estos ratones deficientes de memoria dio lugar a la recuperación de la pérdida de ORM.

Por tanto estos resultados en ratas envejecidas y ratones-AD muestran que el tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ en el área V2, no solo es suficiente para recuperar la pérdida de ORM en ratas envejecidas y ratones-AD sino también para el mantenimiento de un nivel de ORM elevado durante un largo tiempo. Estas observaciones sugieren que el tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ en el área V2 podría servir como acercamiento terapéutico frente a la pérdida de memoria episódica.

2 El efecto de RGS14 está mediado por GluR2

Con la idea de averiguar cómo se produce el aumento de memoria mediado por RGS14₄₁₄ en condiciones normales y elucidar las vías potenciadoras de la memoria en el cerebro, se empleó una amplia variedad de inhibidores y antagonistas que tenían como diana distintos receptores y moléculas involucrados en el procesamiento de la memoria. Hemos demostrado que los receptores AMPA/Kainato, CaMKII y PARP-1 estaban implicados en el aumento de ORM mediado por RGS14, ya que sus inhibiciones revertían el aumento de la memoria mientras que otras moléculas o receptores, tales como NMDARs, mGluR1a, MKK y PKM ζ no intervenían en el aumento de la ORM mediada por RGS14 ya que sus inhibiciones no mostraron ningún efecto.

Estudios recientes reflejan la existencia de una relación entre los receptores AMPA y CaMKII y PARP-1. Se ha demostrado que CaMKII regula el tráfico de los receptores que contienen la subunidad GluA2 hacia la superficie celular (Lu et al 2014). Sin embargo, la activación de la enzima nuclear PARP-1 produce un cambio en la expresión de las subunidades de los

receptores AMPA, GluA1 y GluA2 ocasionando probablemente una alteración en las funciones sinápticas de los receptores glutamatérgicos (Gerace et al 2014; Gerace et al 2015).

No obstante, considerando su implicación en la formación de la memoria (Griffiths et al 2008; Malkova et al 2015; Winters & Bussey 2005) y la plasticidad sináptica (Bassani et al 2013; Chater & Goda 2014; Fleming & England 2010), decidimos centrarnos en los AMPARs como mecanismo clave del aumento de memoria mediado por RGS14 dejando el estudio de PARP-1 y CaMKII para futuras líneas de investigación. El análisis del nivel de expresión del mRNA de todos los genes de los AMPARs (GluR1-GluR4) indicó la presencia de un aumento notable en el nivel de mRNA de GluR2 en las ratas tratadas con RGS14. Esta observación se confirmó mediante el análisis a nivel proteico. Por tanto, para confirmar si un alto nivel de esta proteína en animales RGS podría ser un reflejo de una participación dinámica de esta subunidad durante el procesamiento de la memoria, analizamos los niveles de la proteína GluR2 a 20, 40, 60 min y 24 h tras la exposición de las ratas a un objeto (figura 42).

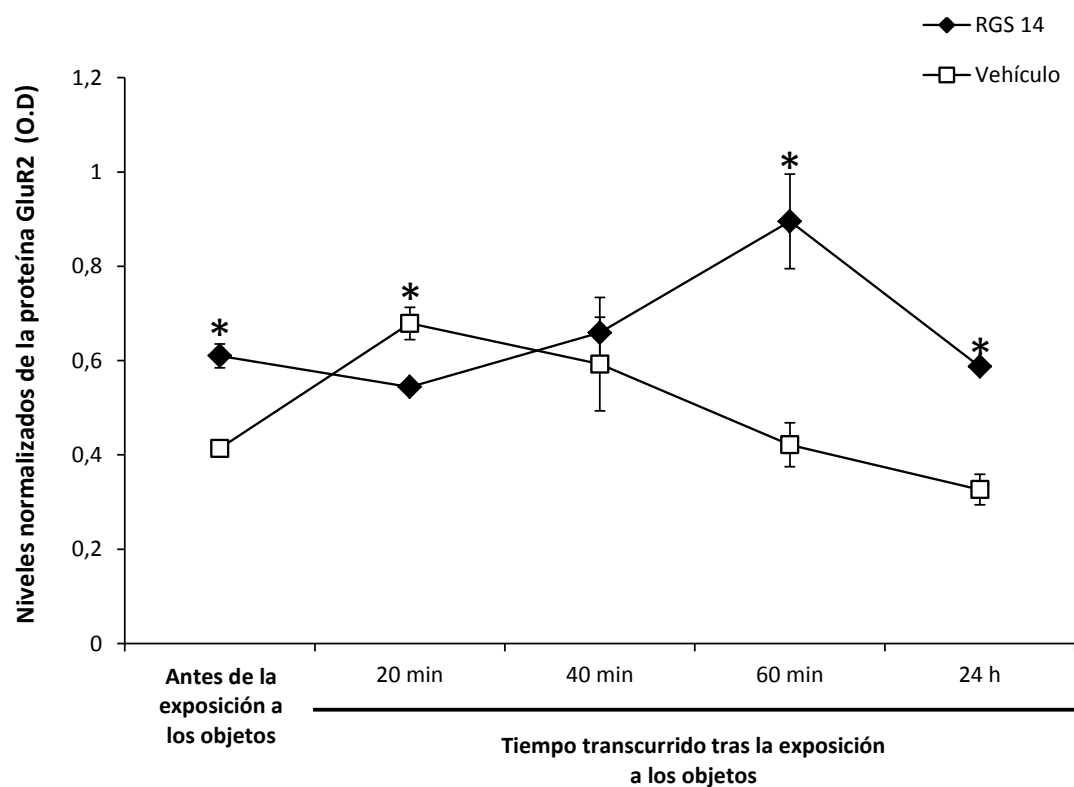


Figura 42. Expresión dinámica de GluR2 durante el procesamiento de la ORM. Los animales RGS mostraron un incremento notable en los niveles de la proteína GluR2. Sin embargo, tras exponer dichos animales a dos objetos idénticos, se observó un incremento progresivo en el nivel de ésta proteína, el cual alcanzó el máximo a los 60 min desde la exposición a los objetos. Por el contrario, los animales controles tratados con vehículo, mostraron altos niveles de expresión de esta proteína a los 20 min desde la exposición al objeto. Datos correspondientes a 3 experimentos. * muestra diferencias significativas intergrupos. ($p \leq 0,05$). O.D: densidad óptica.

El tratamiento con el gen RGS14 causó un incremento progresivo de la expresión de la proteína GluR2, alcanzando los niveles más altos tras 60 min desde la exposición, periodo de tiempo requerido para la conversión de una ORM a corto plazo en una memoria a largo plazo según el procedimiento puesto a punto y llevado a cabo en nuestro laboratorio (Lopez-Aranda et al 2009). Hemos observado que cuando se expusieron ratas normales a un objeto durante 3 min, éstas eran capaces de retener la información en el cerebro durante 45 min (corto plazo) pero no 60 min. Sin embargo, las ratas tratadas con RGS14 eran capaces de retener la misma información durante 24 h e incluso periodos más largos (largo plazo). Por tanto, los altos niveles de la subunidad GluR2 obtenidos a los 60 min concuerdan con la idea de que esta proteína podría ser clave en el aumento de ORM y la conversión a memoria a largo plazo en los animales RGS14. A diferencia del grupo-RGS, los animales tratados con vehículo mostraban altos niveles de expresión de GluR2 a los 20 min y no a los 60 min, e incluso se produjo un descenso progresivo a partir de los 20 min. Estas observaciones, están en concordancia con nuestro argumento de que la sobreexpresión de GluR2 así como su mantenimiento producido por el tratamiento con el gen RGS14 podrían desencadenar el aumento de la ORM y por tanto, podría considerarse una diana importante a tener en cuenta para futuras estrategias de aumento de potenciación de memoria.

3 RGS14 no facilita la plasticidad sináptica hebiana

Teniendo en conocimiento que el tratamiento con el gen RGS14 regula a la alta la proteína GluR2 y el papel de ésta última en la regulación de la plasticidad sináptica (Asrar & Jia 2013; Hugarir & Nicoll 2013; Isaac et al 2007), decidimos explorar como altos niveles de esta proteína en los animales RGS14 podían influir en distintas formas de plasticidad sináptica incluyendo LTP, LTD y despotenciación. Sin embargo, puesto que los estudios en electrofisiología sobre la plasticidad sináptica en relación a la ORM, tal y como se refleja en la literatura, se realizan principalmente en la corteza perirrinal y no en el área V2, se testó el efecto potenciador del tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ sobre la memoria en la corteza perirrinal, con la idea de validar esta área para los posteriores estudios electrofisiológicos. El efecto potenciador de RGS14 sobre la memoria en esta área cerebral fue similar al observado previamente en el área V2, no encontrando diferencias entre las dos áreas. Estos resultados eran de esperar ya que la corteza perirrinal es una de las áreas cerebrales principales que participan en el circuito neuronal responsable de la ORM (Brown & Aggleton 2001; Kim et al

2014; Lech & Suchan 2013; Martin et al 2013; Ranganath & Ritchey 2012; Warburton & Brown 2010; Watson & Lee 2013), y que la mediación celular del efecto de RGS14 no debería discriminar entre las neuronas del área V2 y las de la corteza perirrinal. El estudio *in vitro* de los registros de los potenciales de campo extracelulares en la corteza perirrinal de cortes de cerebro de ratas tratadas con RGS14 mostró que no se producía ningún efecto sobre la LTP y LTD al aplicar altos niveles de estimulación (100 Hz para LTP y 50 μ M de carbachol para LTD), mientras que bajos niveles de estimulación (20 Hz para LTP y 20 μ M de carbachol para LTD) reducían el mantenimiento de estas formas de plasticidad sináptica. Además, el tratamiento con RGS14 bloqueó la inducción de la despotenciación generada por una estimulación de baja frecuencia de 1 Hz volviendo a los niveles previos de LTP una vez terminada la aplicación de esta estimulación. Estos resultados ponían de manifiesto que el tratamiento con el gen RGS14 no favorecía la plasticidad sináptica hebiana, incluso en presencia de altos niveles de concentración de la proteína RGS14. A pesar de que los mecanismos implicados en la alteración de la plasticidad sináptica han de ser todavía determinados, proponemos la hipótesis de que la reducción en la entrada de calcio debido al bloqueo de los canales de calcio tipo L mediado por RGS14 podría ser la causante de las alteraciones observadas en la plasticidad sináptica hebiana. Esta hipótesis se basa en que RGS14₄₁₄ reduce los niveles de calcio intracelular mediante el bloqueo de los canales de calcio tipo L (Martin-Montanez et al 2010) y en que los niveles intracelulares de calcio están directamente implicados en las diferentes formas de plasticidad sináptica hebiana (Baker et al 2013).

Cabe destacar, que además de la mejora sobre la memoria espacial demostrada en roedores tras la administración de antagonistas de canales de calcio tipo L (Levy et al 1991; Quartermain et al 2001), varios estudios reflejan la existencia de una conexión entre los antagonistas de canales de calcio y la recuperación de la pérdida de memoria. La nimodipina, un bloqueador de los canales de calcio tipo L, previene tanto la aparición de las alteraciones de la memoria asociadas a la edad en roedores envejecidos (Batuecas et al 1998; Hopp et al 2014; Ingram et al 1994; Moyer et al 1992; Thompson et al 1990) como la pérdida de memoria causada por la abstinencia al alcohol o morfina en roedores (Brooks et al 2008; Brooks et al 2002; Vaseghi et al 2014; Vaseghi et al 2012). Asimismo, la evidencia epidemiológica muestra que el antagonismo de los receptores de calcio tipo L está asociado con una menor prevalencia de la enfermedad de Alzheimer (AD) (Anekonda & Quinn 2011; Lopez-Arrieta & Birks 2002). En este sentido, los pacientes con AD a los cuales se les

suministró el antagonista de canales de calcio tipo L, nimodipina mostraron una mejora en comparación con los pacientes tratados con placebo en varias medidas cognitivas (Tollefson 1990).

Por otro lado, cabe señalar también que una alteración en la plasticidad sináptica hebiana en los animales RGS14 no implica que no pueda haber un aumento de la ORM en estos animales. De hecho, existen cada vez más evidencias en la literatura que muestran un aumento de memoria independiente de esta forma de plasticidad, y que relacionan la memoria con las formas no hebianas de plasticidad sináptica como pueden ser la plasticidad intrínseca y el *synaptic scaling* (Baker-Andresen et al 2013; Nelson & Turrigiano 2008). Por tanto, el aumento de memoria mediado por RGS14 podría explicarse con una facilitación del *synaptic scaling*, la forma más estudiada de la plasticidad homeostática en las sinapsis excitatorias centrales (Davis 2006; Turrigiano 2008; Turrigiano & Nelson 2004), la cual se ha visto en una variedad de neuronas centrales tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo las neuronas neocorticales, las piramidales hipocampales y las espinales (Chandler & Grossberg 2012; Desai et al 2002; Goel & Lee 2007; Kim & Tsien 2008; Knogler et al 2010; O'Brien et al 1998; Stellwagen & Malenka 2006; Turrigiano et al 1998). Por tanto, aunque no disponemos de datos que confirmen la implicación de la plasticidad sináptica no hebiana o de los niveles de calcio intracelular en este proceso, este laboratorio continúa explorando esta ruta para dar una posible explicación al aumento de la ORM en ratas RGS14.

4 Áreas independientes del cerebro pueden promover la recuperación de la ORM mediada por RGS14

La parte más sorprendente de nuestros resultados que muestran la recuperación de la pérdida de ORM en modelos de roedores era demostrar cómo la activación del área V2, un área cerebral que nunca se ha relacionado con la disfunción de la memoria, es capaz de corregir el déficit de memoria, que podría haberse originado mediante dos mecanismos diferentes. Se piensa que el procesamiento de la ORM en el cerebro esta mediado por un circuito neuronal especializado, el cual se forma mediante la participación de varias áreas cerebrales. En este circuito neuronal, el papel en el reconocimiento de objetos tanto de la corteza perirrinal (Brown & Aggleton 2001; Kim et al 2014; Lech & Suchan 2013; Martin et al 2013; Ranganath & Ritchey 2012; Warburton & Brown 2010; Watson & Lee 2013) como el de la corteza frontal (Banks et al 2012; Swick & Knight 1999; Warburton & Brown 2010)

han sido ampliamente estudiados y ahora nuestro laboratorio ha descubierto que el área V2 (Lopez-Aranda et al 2006) juega un papel importante en el procesamiento de la ORM. Por ello, propusimos que si la activación del área V2 mediante el tratamiento con RGS14 podía recuperar la pérdida de memoria, el mismo tratamiento tanto en la corteza frontal como en la corteza perirrinal debería producir el mismo efecto sobre la memoria. Para simular el déficit de ORM manifestado en muchas condiciones de enfermedades cerebrales y del envejecimiento, originamos lesiones en el área V2, la corteza frontal y la corteza perirrinal. Se vio como las lesiones en cualquiera de estas tres áreas producía un daño considerable y una pérdida significativa de la ORM. Además, el tratamiento con RGS14 en una de las áreas no lesionadas de entre estas 3 áreas cerebrales promovía la recuperación de la memoria hasta un nivel normal. La actividad asociada con la recuperación de la pérdida de la memoria mediante el tratamiento con RGS14 era de tal magnitud que se producía incluso cuando dos de las tres áreas se lesionaban. Nuestros resultados sobre la recuperación de la pérdida de la memoria en ratas mediante la producción de lesión sugieren que el área V2, la corteza frontal y la corteza perirrinal son zonas adecuadas para llevar a cabo un tratamiento con RGS sobre una de estas áreas de forma independiente a pesar de desconocer la localización en el cerebro de la causa principal de la pérdida de memoria. Teniendo en cuenta que la lesión producida, empleando Ox7-SAP como herramienta, elimina selectivamente las neuronas sin afectar a otras estructuras como pueden ser las fibras de paso, la información aún podría pasar a través de las áreas cerebrales dañadas. A la luz de estas observaciones, nuestros resultados indican que la activación neuronal mediada por RGS14 contribuye a la estabilización y por tanto a la normalización de la disfunción del circuito de la ORM que atraviesa varias áreas cerebrales.

5 Mecanismo de la potenciación de la memoria mediada por RGS14 y la recuperación de la pérdida de ORM

Los mecanismos conducentes a la recuperación de la pérdida de ORM tanto en los dos modelos de roedores como en las ratas con lesiones selectivas parecen estar asociados a la estimulación de la actividad de GluR2. Se ha demostrado una regulación a la baja de los niveles de GluR2 en el envejecimiento normal (Liu et al 2008; Yu et al 2011) y en la enfermedad de Alzheimer (Resende et al 2007). Se piensa que esta disminución en los niveles de la subunidad GluR2 de los receptores AMPA es la responsable del aumento significativo

en la concentración del calcio citosólico, el cual como consecuencia conduce a una distrofia dendrítica y a una alteración de la función sináptica (Hof et al 2002; Resende et al 2007).

La normalización de los niveles de GluR2 tras el tratamiento con RGS14₄₁₄ podía dar lugar a una disminución de las concentraciones de calcio citosólicas como se vio previamente (Martin-Montanez et al 2010). Además del trabajo de esta tesis, nuestro laboratorio ha descubierto que el tratamiento con el gen RGS14 produce una fuerte arborización neuronal (Navarro-Lobato 2015). Por tanto, se plantea que el incremento en las conexiones neuronales no sólo promueve la reestructuración del circuito responsable del aumento de la ORM mediado por RGS14 sino que también facilita el flujo de la información durante el procesamiento de ORM. Se ha demostrado que la pérdida de los receptores AMPA en las células postsinápticas conlleva a un deterioro de la estabilidad de la ramificación dendrítica (Haas et al 2006), sin embargo, la sobreexpresión de las subunidades de los receptores AMPA se ha asociado con un incremento del número de segmentos de las ramificaciones (Chen et al 2009; Prithviraj et al 2008). También se ha demostrado que la sobreexpresión de GluR2 conlleva a un aumento de la densidad de las espinas en el hipocampo (Passafaro et al 2003) y de la longitud dendrítica de la neuronas corticales en desarrollo en embriones de ratas (Chen et al 2009), mientras que una regulación a la baja de GluR2 produce una pérdida de los segmentos de la ramificación dendrítica en el hipocampo (Passafaro et al 2003) y una reducción en la arborización dendrítica de las motoneuronas espinales en desarrollo en embriones de pollo (Yoon et al 2012).

A pesar de que queda un largo camino por recorrer para conocer con exactitud el completo mecanismo implicado en el aumento de la memoria mediado por RGS14 y la recuperación de la pérdida de memoria, los resultados del presente trabajo sugieren que la sobreexpresión de GluR2 podría ser el desencadenante del aumento de la arborización dendrítica promoviendo la aparición de nuevas sinapsis y causando así una reestructuración del circuito responsable del aumento de la ORM mediado por RGS14. Y lo que es más importante, hemos demostrado que la pérdida de una memoria episódica (ORM) puede ser recuperada mediante un tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ en el área V2, la corteza frontal o la corteza perirrinal siendo esta recuperación independiente de dónde se localice el origen de la pérdida de memoria en el cerebro. Por tanto, un tratamiento es posible, sin necesidad de conocer el área o las áreas del cerebro implicadas en la pérdida de memoria. El presente trabajo proporciona una plataforma

estratégica para el tratamiento de la pérdida de memoria observada en muchas enfermedades neurodegenerativas y en el envejecimiento normal.

VI. Conclusiones

1. El tratamiento con el gen RGS14 no solo dio lugar a una total recuperación de la pérdida de una memoria episódica en modelos de roedores con envejecimiento normal y enfermedad de Alzheimer, sino que también ayudó al mantenimiento de niveles elevados de ORM por largo tiempo.
2. GluR2, subunidad del receptor AMPA, es un componente clave en la potenciación de la ORM mediada por RGS14. Además de mostrarse una regulación a la alta de los niveles de esta proteína, se observó su participación dinámica en la conversión de memoria a corto plazo a memoria a largo plazo.
3. El tratamiento con el gen RGS14₄₁₄ no favoreció la plasticidad sináptica hebbiana, la cual incluía LTP, LTD dependiente de receptores muscarínicos y despotenciación. Pese a que la causa de este déficit en la plasticidad ha de ser encontrada, creemos que la disminución en el flujo de calcio a través del bloqueo de los receptores de calcio tipo L por parte de RGS14 podría desencadenar las alteraciones vistas en este tipo de plasticidad sináptica. Por otra parte, sugerimos que la potenciación de la memoria mediada por RGS14 podría deberse a formas no hebianas de plasticidad.
4. El área V2, la corteza frontal y la corteza perirrinal son áreas implicadas en el circuito responsable del procesamiento de la ORM y participan de forma independiente en la potenciación de la memoria mediada por RGS14. La independencia que caracteriza a cada área en la potenciación de la memoria sugiere la idoneidad de cada una de ellas de forma separada como tratamiento de la pérdida de la memoria, aún desconociendo la localización de la causa primaria en el cerebro.
5. Los resultados correspondientes a la recuperación de la pérdida de la memoria en modelos de roedores y de la potenciación de la memoria en ratas lesionadas sugieren que una terapia con el gen RGS14₄₁₄ podría ser empleada como una estrategia viable para el tratamiento de la pérdida de memoria en pacientes.

VII. Bibliografía

- Abe H, Ishida Y, Iwasaki T. 2004. Perirhinal N-methyl-D-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. *Neurosci Lett* 356:191-4
- Abraham WC, Robins A. 2005. Memory retention--the synaptic stability versus plasticity dilemma. *Trends Neurosci* 28:73-8
- Acosta-Cabronero J, Williams GB, Pengas G, Nestor PJ. 2010. Absolute diffusivities define the landscape of white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Brain* 133:529-39
- Agster KL, Burwell RD. 2013. Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Behav Brain Res* 254:50-64
- Aicardi G, Argilli E, Cappello S, Santi S, Riccio M, et al. 2004. Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15788-92
- Akinleye A, Furqan M, Mukhi N, Ravella P, Liu D. 2013. MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J Hematol Oncol* 6:27
- Albert PR, Robillard L. 2002. G protein specificity: traffic direction required. *Cell Signal* 14:407-18
- Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. 2004. The PARP superfamily. *Bioessays* 26:882-93
- Anderson WW, Collingridge GL. 2007. Capabilities of the WinLTP data acquisition program extending beyond basic LTP experimental functions. *J Neurosci Methods* 162:346-56
- Anderson WW, Fitzjohn SM, Collingridge GL. 2012. Automated multi-slice extracellular and patch-clamp experiments using the WinLTP data acquisition system with automated perfusion control. *J Neurosci Methods* 207:148-60
- Anekonda TS, Quinn JF. 2011. Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine. *Biochim Biophys Acta* 1812:1584-90
- Antunes M, Biala G. 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13:93-110
- Apergis-Schoute AM, Debiec J, Doyere V, LeDoux JE, Schafe GE. 2005. Auditory fear conditioning and long-term potentiation in the lateral amygdala require ERK/MAP kinase signaling in the auditory thalamus: a role for presynaptic plasticity in the fear system. *J Neurosci* 25:5730-9
- Asrar S, Jia Z. 2013. Molecular mechanisms coordinating functional and morphological plasticity at the synapse: role of GluA2/N-cadherin interaction-mediated actin signaling in mGluR-dependent LTD. *Cell Signal* 25:397-402
- Baker-Andresen D, Ratnu VS, Bredy TW. 2013. Dynamic DNA methylation: a prime candidate for genomic metaplasticity and behavioral adaptation. *Trends Neurosci* 36:3-13
- Baker KD, Edwards TM, Rickard NS. 2013. The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 37:1211-39
- Banks PJ, Bashir ZI, Brown MW. 2012. Recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal and prefrontal cortices. *Hippocampus* 22:2012-31
- Banks PJ, Warburton EC, Brown MW, Bashir ZI. 2014. Mechanisms of synaptic plasticity and recognition memory in the perirhinal cortex. *Prog Mol Biol Transl Sci* 122:193-209
- Barker GR, Bashir ZI, Brown MW, Warburton EC. 2006. A temporally distinct role for group I and group II metabotropic glutamate receptors in object recognition memory. *Learn Mem* 13:178-86
- Barnes CA, Rao G, Houston FP. 2000. LTP induction threshold change in old rats at the perforant path--granule cell synapse. *Neurobiol Aging* 21:613-20
- Barnes CA, Rao G, McNaughton BL. 1996. Functional integrity of NMDA-dependent LTP induction mechanisms across the lifespan of F-344 rats. *Learn Mem* 3:124-37
- Bassani S, Folci A, Zapata J, Passafaro M. 2013. AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cell Mol Life Sci* 70:4411-30
- Batuecas A, Pereira R, Centeno C, Pulido JA, Hernandez M, et al. 1998. Effects of chronic nimodipine on working memory of old rats in relation to defects in synaptosomal calcium homeostasis. *Eur J Pharmacol* 350:141-50
- Bauer EP, Schafe GE, LeDoux JE. 2002. NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22:5239-49
- Behe P, Stern P, Wyllie DJ, Nassar M, Schoepfer R, Colquhoun D. 1995. Determination of NMDA NR1 subunit copy number in recombinant NMDA receptors. *Proc Biol Sci* 262:205-13

- Beneyto M, Meador-Woodruff JH. 2004. Expression of transcripts encoding AMPA receptor subunits and associated postsynaptic proteins in the macaque brain. *J Comp Neurol* 468:530-54
- Berger SM, Bartsch D. 2014. The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function. *Cell Tissue Res* 357:463-76
- Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y. 2000. The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J Neurosci* 20:7017-23
- Bilkey DK. 1996. Long-term potentiation in the in vitro perirhinal cortex displays associative properties. *Brain Res* 733:297-300
- Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-9
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. 1987. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237:527-32
- Borrioni AM, Fichtenholtz H, Woodside BL, Teyler TJ. 2000. Role of voltage-dependent calcium channel long-term potentiation (LTP) and NMDA LTP in spatial memory. *J Neurosci* 20:9272-6
- Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-59
- Braak H, Braak E. 1995. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 16:271-8; discussion 8-84
- Brooks SP, Croft AP, Norman G, Shaw SG, Little HJ. 2008. Nimodipine prior to alcohol withdrawal prevents memory deficits during the abstinence phase. *Neuroscience* 157:376-84
- Brooks SP, Hennebry G, McAlpin GP, Norman G, Little HJ. 2002. Nimodipine prevents the effects of ethanol in tests of memory. *Neuropharmacology* 42:577-85
- Brown MW, Aggleton JP. 2001. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* 2:51-61
- Buckner RL. 2004. Memory and executive function in aging and AD: multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate. *Neuron* 44:195-208
- Burke SN, Barnes CA. 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7:30-40
- Burwell RD. 2001. Borders and cytoarchitecture of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *J Comp Neurol* 437:17-41
- Burwell RD, Amaral DG. 1998a. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* 398:179-205
- Burwell RD, Amaral DG. 1998b. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 391:293-321
- Bussey TJ, Saksida LM. 2005. Object memory and perception in the medial temporal lobe: an alternative approach. *Curr Opin Neurobiol* 15:730-7
- Bussey TJ, Saksida LM. 2007. Memory, perception, and the ventral visual-perirhinal-hippocampal stream: thinking outside of the boxes. *Hippocampus* 17:898-908
- Canto CB, Wouterlood FG, Witter MP. 2008. What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plast* 2008:381243
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. 2005. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57:411-25
- Cazakoff BN, Howland JG. 2011. AMPA receptor endocytosis in rat perirhinal cortex underlies retrieval of object memory. *Learn Mem* 18:688-92
- Cetin A, Komai S, Eliava M, Seeburg PH, Osten P. 2006. Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nat Protoc* 1:3166-73
- Citri A, Malenka RC. 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18-41
- Cohen-Armon M. 2007. PARP-1 activation in the ERK signaling pathway. *Trends Pharmacol Sci* 28:556-60
- Cohen-Armon M, Visochek L, Katzoff A, Levitan D, Susswein AJ, et al. 2004. Long-term memory requires polyADP-ribosylation. *Science* 304:1820-2

- Cohen-Armon M, Visochek L, Rozensal D, Kalal A, Geistrikh I, et al. 2007. DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol Cell* 25:297-308
- Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT. 2004. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:952-62
- Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT. 2010. Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 11:459-73
- Conn PJ, Pin JP. 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-37
- Coultrap SJ, Bayer KU. 2012. CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci* 35:607-18
- Cull-Candy S, Kelly L, Farrant M. 2006. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 16:288-97
- Chandler B, Grossberg S. 2012. Joining distributed pattern processing and homeostatic plasticity in recurrent on-center off-surround shunting networks: noise, saturation, short-term memory, synaptic scaling, and BDNF. *Neural Netw* 25:21-9
- Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, et al. 1999. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2:271-6
- Chater TE, Goda Y. 2014. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Front Cell Neurosci* 8:401
- Chen W, Prithviraj R, Mahnke AH, McGloin KE, Tan JW, et al. 2009. AMPA glutamate receptor subunits 1 and 2 regulate dendrite complexity and spine motility in neurons of the developing neocortex. *Neuroscience* 159:172-82
- Cheng D, Hoogenraad CC, Rush J, Ramm E, Schlager MA, et al. 2006. Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol Cell Proteomics* 5:1158-70
- Cheng L, Yin WJ, Zhang JF, Qi JS. 2009. Amyloid beta-protein fragments 25-35 and 31-35 potentiate long-term depression in hippocampal CA1 region of rats in vivo. *Synapse* 63:206-14
- Chittajallu R, Alford S, Collingridge GL. 1998. Ca²⁺ and synaptic plasticity. *Cell Calcium* 24:377-85
- Cho H, Kozasa T, Takekoshi K, De Gunzburg J, Kehrl JH. 2000a. RGS14, a GTPase-activating protein for G α , attenuates G α - and G13 α -mediated signaling pathways. *Mol Pharmacol* 58:569-76
- Cho K, Kemp N, Noel J, Aggleton JP, Brown MW, Bashir ZI. 2000b. A new form of long-term depression in the perirhinal cortex. *Nat Neurosci* 3:150-6
- Chong SA, Benilova I, Shaban H, De Strooper B, Devijver H, et al. 2011. Synaptic dysfunction in hippocampus of transgenic mouse models of Alzheimer's disease: a multi-electrode array study. *Neurobiol Dis* 44:284-91
- Chosewood LC, Wilson DE, Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), National Institutes of Health (U.S.). 2009. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. Washington, D.C.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. xxii, 415 p. pp.
- Davis GW. 2006. Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design. *Annu Rev Neurosci* 29:307-23
- Davis S, Butcher SP, Morris RG. 1992. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J Neurosci* 12:21-34
- Davis S, Laroche S. 2006. Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav* 5 Suppl 2:61-72
- De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG. 2000. The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:235-71
- Dere E, Pause BM, Pietrowsky R. 2010. Emotion and episodic memory in neuropsychiatric disorders. *Behav Brain Res* 215:162-71
- Desai NS, Cudmore RH, Nelson SB, Turrigiano GG. 2002. Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex. *Nat Neurosci* 5:783-9

- Deupree DL, Turner DA, Watters CL. 1991. Spatial performance correlates with in vitro potentiation in young and aged Fischer 344 rats. *Brain Res* 554:1-9
- Diana G, Domenici MR, Loizzo A, Scotti de Carolis A, Sagratella S. 1994a. Age and strain differences in rat place learning and hippocampal dentate gyrus frequency-potentiation. *Neurosci Lett* 171:113-6
- Diana G, Scotti de Carolis A, Frank C, Domenici MR, Sagratella S. 1994b. Selective reduction of hippocampal dentate frequency potentiation in aged rats with impaired place learning. *Brain Res Bull* 35:107-11
- Diana RA, Yonelinas AP, Ranganath C. 2007. Imaging recollection and familiarity in the medial temporal lobe: a three-component model. *Trends Cogn Sci* 11:379-86
- Didic M, Barbeau EJ, Felician O, Tramon E, Guedj E, et al. 2011. Which memory system is impaired first in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 27:11-22
- Dieguez D, Jr., Barea-Rodriguez EJ. 2004. Aging impairs the late phase of long-term potentiation at the medial perforant path-CA3 synapse in awake rats. *Synapse* 52:53-61
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61
- Donaldson W. 1996. The role of decision processes in remembering and knowing. *Mem Cognit* 24:523-33
- Drag LL, Bieliauskas LA. 2010. Contemporary review 2009: cognitive aging. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23:75-93
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, et al. 2007. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6:734-46
- Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C. 2007. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* 30:123-52
- Elgersma Y, Sweatt JD, Giese KP. 2004. Mouse genetic approaches to investigating calcium/calmodulin-dependent protein kinase II function in plasticity and cognition. *J Neurosci* 24:8410-5
- Ennaceur A, Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47-59
- Escribano L, Simon AM, Perez-Mediavilla A, Salazar-Colocho P, Del Rio J, Frechilla D. 2009. Rosiglitazone reverses memory decline and hippocampal glucocorticoid receptor down-regulation in an Alzheimer's disease mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 379:406-10
- Evans PR, Lee SE, Smith Y, Hepler JR. 2014. Postnatal developmental expression of regulator of G protein signaling 14 (RGS14) in the mouse brain. *J Comp Neurol* 522:186-203
- Feldman DE. 2009. Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annu Rev Neurosci* 32:33-55
- Fitzjohn SM, Kuenzi F, Morton RA, Rosahl TW, Lewis H, et al. 2010. A study of long-term potentiation in transgenic mice over-expressing mutant forms of both amyloid precursor protein and presenilin-1. *Mol Brain* 3:21
- Fjell AM, Walhovd KB, Fennema-Notestine C, McEvoy LK, Hagler DJ, et al. 2009. One-year brain atrophy evident in healthy aging. *J Neurosci* 29:15223-31
- Fjell AM, Westlye LT, Grydeland H, Amlien I, Espeseth T, et al. 2014. Accelerating cortical thinning: unique to dementia or universal in aging? *Cereb Cortex* 24:919-34
- Fleming JJ, England PM. 2010. AMPA receptors and synaptic plasticity: a chemist's perspective. *Nat Chem Biol* 6:89-97
- Fontan-Lozano A, Suarez-Pereira I, Horrillo A, del-Pozo-Martin Y, Hmadcha A, Carrion AM. 2010. Histone H1 poly[ADP]-ribosylation regulates the chromatin alterations required for learning consolidation. *J Neurosci* 30:13305-13
- Foster TC. 2007. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* 6:319-25
- Foster TC, Norris CM. 1997. Age-associated changes in Ca(2+)-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 7:602-12
- Furtak SC, Wei SM, Agster KL, Burwell RD. 2007. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: the perirhinal and postrhinal cortices. *Hippocampus* 17:709-22
- Gaffan D. 2002. Against memory systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:1111-21

- Gallagher M, Koh MT. 2011. Episodic memory on the path to Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 21:929-34
- Gerace E, Masi A, Resta F, Felici R, Landucci E, et al. 2014. PARP-1 activation causes neuronal death in the hippocampal CA1 region by increasing the expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. *Neurobiol Dis* 70:43-52
- Gerace E, Pellegrini-Giampietro DE, Moroni F, Mannaioni G. 2015. Poly(ADP-Ribose)Polymerase 1 (PARP-1) Activation and Ca(2+) Permeable alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid (AMPA) Channels in Post-Ischemic Brain Damage: New Therapeutic Opportunities? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 14:636-46
- Gertz HJ, Xuereb J, Huppert F, Brayne C, McGee MA, et al. 1998. Examination of the validity of the hierarchical model of neuropathological staging in normal aging and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 95:154-8
- Gilman AG. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56:615-49
- Goel A, Lee HK. 2007. Persistence of experience-induced homeostatic synaptic plasticity through adulthood in superficial layers of mouse visual cortex. *J Neurosci* 27:6692-700
- Goldberg S, Visochek L, Giladi E, Gozes I, Cohen-Armon M. 2009. PolyADP-ribosylation is required for long-term memory formation in mammals. *J Neurochem* 111:72-9
- Gong B, Vitolo OV, Trinchese F, Liu S, Shelanski M, Arancio O. 2004. Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. *J Clin Invest* 114:1624-34
- Grafstein-Dunn E, Young KH, Cockett MI, Khawaja XZ. 2001. Regional distribution of regulators of G-protein signaling (RGS) 1, 2, 13, 14, 16, and GAIP messenger ribonucleic acids by in situ hybridization in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 88:113-23
- Greger IH, Khatri L, Kong X, Ziff EB. 2003. AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* 40:763-74
- Griffiths S, Scott H, Glover C, Bienemann A, Ghorbel MT, et al. 2008. Expression of long-term depression underlies visual recognition memory. *Neuron* 58:186-94
- Gureviciene I, Ikonen S, Gurevicius K, Sarkaki A, van Groen T, et al. 2004. Normal induction but accelerated decay of LTP in APP + PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 15:188-95
- Haas K, Li J, Cline HT. 2006. AMPA receptors regulate experience-dependent dendritic arbor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12127-31
- Haist F, Shimamura AP, Squire LR. 1992. On the relationship between recall and recognition memory. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn* 18:691-702
- Hamm HE. 1998. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273:669-72
- Hardt O, Miguez PV, Hastings M, Wong J, Nader K. 2010. PKMzeta maintains 1-day- and 6-day-old long-term object location but not object identity memory in dorsal hippocampus. *Hippocampus* 20:691-5
- Harris JA, Devidze N, Halabisky B, Lo I, Thwin MT, et al. 2010. Many neuronal and behavioral impairments in transgenic mouse models of Alzheimer's disease are independent of caspase cleavage of the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 30:372-81
- Head D, Snyder AZ, Girton LE, Morris JC, Buckner RL. 2005. Frontal-hippocampal double dissociation between normal aging and Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 15:732-9
- Hebert AE, Dash PK. 2002. Extracellular signal-regulated kinase activity in the entorhinal cortex is necessary for long-term spatial memory. *Learn Mem* 9:156-66
- Hepler JR, Gilman AG. 1992. G proteins. *Trends Biochem Sci* 17:383-7
- Hernandez AI, Blace N, Crary JF, Serrano PA, Leitges M, et al. 2003. Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. *J Biol Chem* 278:40305-16
- Hof PR, Duan H, Page TL, Einstein M, Wicinski B, et al. 2002. Age-related changes in GluR2 and NMDAR1 glutamate receptor subunit protein immunoreactivity in corticocortically projecting neurons in macaque and patas monkeys. *Brain Res* 928:175-86
- Hollinger S, Hepler JR. 2002. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 54:527-59

- Hollinger S, Taylor JB, Goldman EH, Hepler JR. 2001. RGS14 is a bifunctional regulator of Galphai/o activity that exists in multiple populations in brain. *J Neurochem* 79:941-9
- Hollmann M, Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108
- Hopp SC, D'Angelo HM, Royer SE, Kaercher RM, Adzovic L, Wenk GL. 2014. Differential rescue of spatial memory deficits in aged rats by L-type voltage-dependent calcium channel and ryanodine receptor antagonism. *Neuroscience* 280:10-8
- Huganir RL, Nicoll RA. 2013. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron* 80:704-17
- Ichim CV, Wells RA. 2011. Generation of high-titer viral preparations by concentration using successive rounds of ultracentrifugation. *J Transl Med* 9:137
- Ingram DK, Joseph JA, Spangler EL, Roberts D, Hengemihle J, Fanelli RJ. 1994. Chronic nimodipine treatment in aged rats: analysis of motor and cognitive effects and muscarinic-induced striatal dopamine release. *Neurobiol Aging* 15:55-61
- Insausti R, Herrero MT, Witter MP. 1997. Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus* 7:146-83
- Irvine EE, von Herten LS, Plattner F, Giese KP. 2006. alphaCaMKII autophosphorylation: a fast track to memory. *Trends Neurosci* 29:459-65
- Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. 2007. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* 54:859-71
- Ju BG, Solum D, Song EJ, Lee KJ, Rose DW, et al. 2004. Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase IIdelta-dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell* 119:815-29
- Kajiwara R, Takashima I, Mimura Y, Witter MP, Iijima T. 2003. Amygdala input promotes spread of excitatory neural activity from perirhinal cortex to the entorhinal-hippocampal circuit. *J Neurophysiol* 89:2176-84
- Kealy J, Commins S. 2011. The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Prog Neurobiol* 93:522-48
- Keinanen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, et al. 1990. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249:556-60
- Kelly A, Laroche S, Davis S. 2003. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* 23:5354-60
- Killiany RJ, Hyman BT, Gomez-Isla T, Moss MB, Kikinis R, et al. 2002. MRI measures of entorhinal cortex vs hippocampus in preclinical AD. *Neurology* 58:1188-96
- Kim J, Tsien RW. 2008. Synapse-specific adaptations to inactivity in hippocampal circuits achieve homeostatic gain control while dampening network reverberation. *Neuron* 58:925-37
- Kim JH, Anwyl R, Suh YH, Djamgoz MB, Rowan MJ. 2001. Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of (beta)-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo. *J Neurosci* 21:1327-33
- Kim JM, Kim DH, Lee Y, Park SJ, Ryu JH. 2014. Distinct roles of the hippocampus and perirhinal cortex in GABAA receptor blockade-induced enhancement of object recognition memory. *Brain Res* 1552:17-25
- Kimple RJ, De Vries L, Tronchere H, Behe CI, Morris RA, et al. 2001. RGS12 and RGS14 GoLoco motifs are G alpha(i) interaction sites with guanine nucleotide dissociation inhibitor Activity. *J Biol Chem* 276:29275-81
- Kitazawa M, Medeiros R, Laferla FM. 2012. Transgenic mouse models of Alzheimer disease: developing a better model as a tool for therapeutic interventions. *Curr Pharm Des* 18:1131-47
- Knobloch M, Farinelli M, Konietzko U, Nitsch RM, Mansuy IM. 2007. Abeta oligomer-mediated long-term potentiation impairment involves protein phosphatase 1-dependent mechanisms. *J Neurosci* 27:7648-53
- Knogler LD, Liao M, Drapeau P. 2010. Synaptic scaling and the development of a motor network. *J Neurosci* 30:8871-81
- Krum JM, Kenyon KL, Rosenstein JM. 1997. Expression of blood-brain barrier characteristics following neuronal loss and astroglial damage after administration of anti-Thy-1 immunotoxin. *Exp Neurol* 146:33-45

- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5
- Larminie C, Murdock P, Walhin JP, Duckworth M, Blumer KJ, et al. 2004. Selective expression of regulators of G-protein signaling (RGS) in the human central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 122:24-34
- Lashgari R, Motamedi F, Zahedi Asl S, Shahidi S, Komaki A. 2006. Behavioral and electrophysiological studies of chronic oral administration of L-type calcium channel blocker verapamil on learning and memory in rats. *Behav Brain Res* 171:324-8
- Laube B, Kuhse J, Betz H. 1998. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18:2954-61
- Lautier D, Lagueux J, Thibodeau J, Menard L, Poirier GG. 1993. Molecular and biochemical features of poly (ADP-ribose) metabolism. *Mol Cell Biochem* 122:171-93
- Lech RK, Suchan B. 2013. The medial temporal lobe: memory and beyond. *Behav Brain Res* 254:45-9
- Lee SE, Simons SB, Heldt SA, Zhao M, Schroeder JP, et al. 2010. RGS14 is a natural suppressor of both synaptic plasticity in CA2 neurons and hippocampal-based learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16994-8
- Lee YS, Silva AJ. 2009. The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:126-40
- Leon WC, Bruno MA, Allard S, Nader K, Cuello AC. 2010. Engagement of the PFC in consolidation and recall of recent spatial memory. *Learn Mem* 17:297-305
- Levy A, Kong RM, Stillman MJ, Shukitt-Hale B, Kadar T, et al. 1991. Nimodipine improves spatial working memory and elevates hippocampal acetylcholine in young rats. *Pharmacol Biochem Behav* 39:781-6
- Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. 2009. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 62:788-801
- Li YQ, Xue YX, He YY, Li FQ, Xue LF, et al. 2011. Inhibition of PKMzeta in nucleus accumbens core abolishes long-term drug reward memory. *J Neurosci* 31:5436-46
- Lisman J, Schulman H, Cline H. 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3:175-90
- Liu P, Smith PF, Darlington CL. 2008. Glutamate receptor subunits expression in memory-associated brain structures: regional variations and effects of aging. *Synapse* 62:834-41
- Lopez-Aranda MF, Acevedo MJ, Carballo FJ, Gutierrez A, Khan ZU. 2006. Localization of the GoLoco motif carrier regulator of G-protein signalling 12 and 14 proteins in monkey and rat brain. *Eur J Neurosci* 23:2971-82
- Lopez-Aranda MF, Lopez-Tellez JF, Navarro-Lobato I, Masmudi-Martin M, Gutierrez A, Khan ZU. 2009. Role of layer 6 of V2 visual cortex in object-recognition memory. *Science* 325:87-9
- Lopez-Arrieta JM, Birks J. 2002. Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia. *Cochrane Database Syst Rev*:CD000147
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75
- Lu KT, Walker DL, Davis M. 2001. Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *J Neurosci* 21:RC162
- Lu W, Khatri L, Ziff EB. 2014. Trafficking of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) receptor subunit GluA2 from the endoplasmic reticulum is stimulated by a complex containing Ca²⁺/calmodulin-activated kinase II (CaMKII) and PICK1 protein and by release of Ca²⁺ from internal stores. *J Biol Chem* 289:19218-30
- Lu W, Shi Y, Jackson AC, Bjorgan K, Doring MJ, et al. 2009. Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* 62:254-68
- Lucchesi W, Mizuno K, Giese KP. 2011. Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation. *Brain Res Bull* 85:2-8
- Malkova L, Forcelli PA, Wellman LL, Dybdal D, Dubach MF, Gale K. 2015. Blockade of glutamatergic transmission in perirhinal cortex impairs object recognition memory in macaques. *J Neurosci* 35:5043-50

- Marchetti C, Marie H. 2011. Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer's disease: what have we learned so far from transgenic models? *Rev Neurosci* 22:373-402
- Martin-Montanez E, Acevedo MJ, Lopez-Tellez JF, Duncan RS, Mateos AG, et al. 2010. Regulator of G-protein signaling 14 protein modulates Ca(2)+ influx through Cav1 channels. *Neuroreport* 21:1034-9
- Martin CB, McLean DA, O'Neil EB, Kohler S. 2013. Distinct familiarity-based response patterns for faces and buildings in perirhinal and parahippocampal cortex. *J Neurosci* 33:10915-23
- Martin SJ, Morris RG. 2002. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12:609-36
- Massey PV, Bhabra G, Cho K, Brown MW, Bashir ZI. 2001. Activation of muscarinic receptors induces protein synthesis-dependent long-lasting depression in the perirhinal cortex. *Eur J Neurosci* 14:145-52
- Massey PV, Johnson BE, Moulton PR, Auberson YP, Brown MW, et al. 2004. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 24:7821-8
- McCaffery B, Cho K, Bortolotto ZA, Aggleton JP, Brown MW, et al. 1999. Synaptic depression induced by pharmacological activation of metabotropic glutamate receptors in the perirhinal cortex in vitro. *Neuroscience* 93:977-84
- Mead AN, Stephens DN. 2003. Involvement of AMPA receptor GluR2 subunits in stimulus-reward learning: evidence from glutamate receptor *gria2* knock-out mice. *J Neurosci* 23:9500-7
- Migues PV, Hardt O, Wu DC, Gamache K, Sacktor TC, et al. 2010. PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci* 13:630-4
- Mittal V, Linder ME. 2004. The RGS14 GoLoco domain discriminates among Gα_q isoforms. *J Biol Chem* 279:46772-8
- Mittal V, Linder ME. 2006. Biochemical characterization of RGS14: RGS14 activity towards G-protein α subunits is independent of its binding to Rap2A. *Biochem J* 394:309-15
- Moore CI, Browning MD, Rose GM. 1993. Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged Fischer 344 rats. *Hippocampus* 3:57-66
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-6
- Moyer JR, Jr., Thompson LT, Black JP, Disterhoft JF. 1992. Nimodipine increases excitability of rabbit CA1 pyramidal neurons in an age- and concentration-dependent manner. *J Neurophysiol* 68:2100-9
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, et al. 2000. High-level neuronal expression of Aβ₁₋₄₂ in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050-8
- Murray EA, Bussey TJ, Saksida LM. 2007. Visual perception and memory: a new view of medial temporal lobe function in primates and rodents. *Annu Rev Neurosci* 30:99-122
- Naie K, Manahan-Vaughan D. 2005. Pharmacological antagonism of metabotropic glutamate receptor 1 regulates long-term potentiation and spatial reference memory in the dentate gyrus of freely moving rats via N-methyl-D-aspartate and metabotropic glutamate receptor-dependent mechanisms. *Eur J Neurosci* 21:411-21
- Navarro-Lobato I. 2015. *RGS14₄₁₄-mediated prevention of an episodic memory loss: a study of molecular mechanism*. Ph.D. thesis. Universidad de Málaga, Málaga
- Nelson SB, Turrigiano GG. 2008. Strength through diversity. *Neuron* 60:477-82
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R. 2002. G protein pathways. *Science* 296:1636-9
- Nolan BC, Freeman JH, Jr. 2005. Purkinje cell loss by OX7-saporin impairs excitatory and inhibitory eyeblink conditioning. *Behav Neurosci* 119:190-201
- Norris CM, Korol DL, Foster TC. 1996. Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging. *J Neurosci* 16:5382-92
- Nyberg L, Lovden M, Riklund K, Lindenberger U, Backman L. 2012. Memory aging and brain maintenance. *Trends Cogn Sci* 16:292-305

- O'Brien RJ, Kamboj S, Ehlers MD, Rosen KR, Fischbach GD, Huganir RL. 1998. Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron* 21:1067-78
- Oster H, Eichele G, Leitges M. 2004. Differential expression of atypical PKCs in the adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 127:79-88
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, et al. 2007. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55:697-711
- Passafaro M, Nakagawa T, Sala C, Sheng M. 2003. Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature* 424:677-81
- Paxinos G, Franklin KBJ. 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8392-6
- Persson J, Pudas S, Lind J, Kauppi K, Nilsson LG, Nyberg L. 2012. Longitudinal structure-function correlates in elderly reveal MTL dysfunction with cognitive decline. *Cereb Cortex* 22:2297-304
- Petersen RC. 2000. Aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Neurol Clin* 18:789-806
- Premkumar LS, Auerbach A. 1997. Stoichiometry of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns. *J Gen Physiol* 110:485-502
- Prithviraj R, Kelly KM, Espinoza-Lewis R, Hexom T, Clark AB, Inglis FM. 2008. Differential regulation of dendrite complexity by AMPA receptor subunits GluR1 and GluR2 in motor neurons. *Dev Neurobiol* 68:247-64
- Puzzo D, Privitera L, Fa M, Staniszewski A, Hashimoto G, et al. 2011. Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol* 69:819-30
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, et al. 2008. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 28:14537-45
- Quartermain D, deSoria VG, Kwan A. 2001. Calcium channel antagonists enhance retention of passive avoidance and maze learning in mice. *Neurobiol Learn Mem* 75:77-90
- Ranganath C, Ritchey M. 2012. Two cortical systems for memory-guided behaviour. *Nat Rev Neurosci* 13:713-26
- Raz N, Lindenberger U, Rodrigue KM, Kennedy KM, Head D, et al. 2005. Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers. *Cereb Cortex* 15:1676-89
- Reiser J. 2000. Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. *Gene Ther* 7:910-3
- Resende R, Pereira C, Agostinho P, Vieira AP, Malva JO, Oliveira CR. 2007. Susceptibility of hippocampal neurons to Abeta peptide toxicity is associated with perturbation of Ca²⁺ homeostasis. *Brain Res* 1143:11-21
- Rodrigue KM, Raz N. 2004. Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults. *J Neurosci* 24:956-63
- Rosenzweig ES, Rao G, McNaughton BL, Barnes CA. 1997. Role of temporal summation in age-related long-term potentiation-induction deficits. *Hippocampus* 7:549-58
- Ross EM, Wilkie TM. 2000. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 69:795-827
- Rouleau M, Aubin RA, Poirier GG. 2004. Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J Cell Sci* 117:815-25
- Sacktor TC. 2011. How does PKMzeta maintain long-term memory? *Nat Rev Neurosci* 12:9-15
- Saganich MJ, Schroeder BE, Galvan V, Bredesen DE, Koo EH, Heinemann SF. 2006. Deficits in synaptic transmission and learning in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice require C-terminal cleavage of APP. *J Neurosci* 26:13428-36
- Sagata N, Iwaki A, Aramaki T, Takao K, Kura S, et al. 2010. Comprehensive behavioural study of GluR4 knockout mice: implication in cognitive function. *Genes Brain Behav* 9:899-909

- Salmon DP. 2012. Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease. *Curr Top Behav Neurosci* 10:187-212
- Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE. 2000. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 20:8177-87
- Schiapparelli L, Simon AM, Del Rio J, Frechilla D. 2006. Opposing effects of AMPA and 5-HT1A receptor blockade on passive avoidance and object recognition performance: correlation with AMPA receptor subunit expression in rat hippocampus. *Neuropharmacology* 50:897-907
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:517-28
- Seoane A, Massey PV, Keen H, Bashir ZI, Brown MW. 2009. L-type voltage-dependent calcium channel antagonists impair perirhinal long-term recognition memory and plasticity processes. *J Neurosci* 29:9534-44
- Serrano P, Friedman EL, Kenney J, Taubenfeld SM, Zimmerman JM, et al. 2008. PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. *PLoS Biol* 6:2698-706
- Shalin SC, Zirrgiebel U, Honsa KJ, Julien JP, Miller FD, et al. 2004. Neuronal MEK is important for normal fear conditioning in mice. *J Neurosci Res* 75:760-70
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, et al. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837-42
- Shema R, Haramati S, Ron S, Hazvi S, Chen A, et al. 2011. Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase Mzeta in the neocortex. *Science* 331:1207-10
- Shema R, Hazvi S, Sacktor TC, Dudai Y. 2009. Boundary conditions for the maintenance of memory by PKMzeta in neocortex. *Learn Mem* 16:122-8
- Shing YL, Werkle-Bergner M, Brehmer Y, Muller V, Li SC, Lindenberger U. 2010. Episodic memory across the lifespan: the contributions of associative and strategic components. *Neurosci Biobehav Rev* 34:1080-91
- Shu FJ, Ramineni S, Amyot W, Hepler JR. 2007. Selective interactions between Gi alpha1 and Gi alpha3 and the GoLoco/GPR domain of RGS14 influence its dynamic subcellular localization. *Cell Signal* 19:163-76
- Shu FJ, Ramineni S, Hepler JR. 2010. RGS14 is a multifunctional scaffold that integrates G protein and Ras/Raf MAPkinase signalling pathways. *Cell Signal* 22:366-76
- Simonyi A, Serfozo P, Shelat PB, Dopheide MM, Coulibaly AP, Schachtman TR. 2007. Differential roles of hippocampal metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in inhibitory avoidance learning. *Neurobiol Learn Mem* 88:305-11
- Snow BE, Antonio L, Suggs S, Gutstein HB, Siderovski DP. 1997. Molecular cloning and expression analysis of rat Rgs12 and Rgs14. *Biochem Biophys Res Commun* 233:770-7
- Squire LR, Stark CE, Clark RE. 2004. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 27:279-306
- Squire LR, Wixted JT, Clark RE. 2007. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci* 8:872-83
- Stellwagen D, Malenka RC. 2006. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature* 440:1054-9
- Stern SA, Alberini CM. 2013. Mechanisms of memory enhancement. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 5:37-53
- Swanson GT, Kamboj SK, Cull-Candy SG. 1997. Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *J Neurosci* 17:58-69
- Swick D, Knight RT. 1999. Contributions of prefrontal cortex to recognition memory: electrophysiological and behavioral evidence. *Neuropsychology* 13:155-70
- Sydow A, Van der Jeugd A, Zheng F, Ahmed T, Balschun D, et al. 2011. Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant. *J Neurosci* 31:2511-25
- Taylor KI, Probst A. 2008. Anatomic localization of the transentorhinal region of the perirhinal cortex. *Neurobiol Aging* 29:1591-6

- Thompson LT, Deyo RA, Disterhoft JF. 1990. Nimodipine enhances spontaneous activity of hippocampal pyramidal neurons in aging rabbits at a dose that facilitates associative learning. *Brain Res* 535:119-30
- Tinsley CJ, Fontaine-Palmer NS, Vincent M, Endean EP, Aggleton JP, et al. 2011. Differing time dependencies of object recognition memory impairments produced by nicotinic and muscarinic cholinergic antagonism in perirhinal cortex. *Learn Mem* 18:484-92
- Tinsley CJ, Narduzzo KE, Ho JW, Barker GR, Brown MW, Warburton EC. 2009. A role for calcium-calmodulin-dependent protein kinase II in the consolidation of visual object recognition memory. *Eur J Neurosci* 30:1128-39
- Tollefson GD. 1990. Short-term effects of the calcium channel blocker nimodipine (Bay-e-9736) in the management of primary degenerative dementia. *Biol Psychiatry* 27:1133-42
- Tombaugh GC, Rowe WB, Chow AR, Michael TH, Rose GM. 2002. Theta-frequency synaptic potentiation in CA1 in vitro distinguishes cognitively impaired from unimpaired aged Fischer 344 rats. *J Neurosci* 22:9932-40
- Traissard N, Herbeaux K, Cosquer B, Jeltsch H, Ferry B, et al. 2007. Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer's disease: effects on locomotor activity and memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology* 32:851-71
- Traver S, Bidot C, Spassky N, Baltauss T, De Tand MF, et al. 2000. RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of galphao. *Biochem J* 350 Pt 1:19-29
- Traver S, Spingard A, Gaudriault G, De Gunzburg J. 2004. The RGS (regulator of G-protein signalling) and GoLoco domains of RGS14 co-operate to regulate Gi-mediated signalling. *Biochem J* 379:627-32
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, et al. 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62:405-96
- Trinchese F, Liu S, Battaglia F, Walter S, Mathews PM, Arancio O. 2004. Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann Neurol* 55:801-14
- Turrigiano GG. 2008. The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135:422-35
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB. 1998. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391:892-6
- Turrigiano GG, Nelson SB. 2004. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5:97-107
- van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP. 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 10:272-82
- Vaseghi G, Hajhashemi V, Rabbani M. 2014. The effect of nimodipine on memory loss following naloxone-induced morphine withdrawal in object recognition. *Res Pharm Sci* 9:445-51
- Vaseghi G, Rabbani M, Hajhashemi V. 2012. The effect of nimodipine on memory impairment during spontaneous morphine withdrawal in mice: Corticosterone interaction. *Eur J Pharmacol* 695:83-7
- Volk LJ, Bachman JL, Johnson R, Yu Y, Haganir RL. 2013. PKM-zeta is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. *Nature* 493:420-3
- Wang SH, Liao XM, Liu D, Hu J, Yin YY, et al. 2012. NGF promotes long-term memory formation by activating poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Neuropharmacology* 63:1085-92
- Warburton EC, Brown MW. 2010. Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia* 48:2262-72
- Warburton EC, Koder T, Cho K, Massey PV, Duguid G, et al. 2003. Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron* 38:987-96
- Watson HC, Lee AC. 2013. The perirhinal cortex and recognition memory interference. *J Neurosci* 33:4192-200
- Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva AJ, Soderling TR. 2008. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* 59:914-31
- Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J, II, Niedzielski AS. 1996. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16:1982-9

- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313:1093-7
- Willard FS, Willard MD, Kimple AJ, Soundararajan M, Oestreich EA, et al. 2009. Regulator of G-protein signaling 14 (RGS14) is a selective H-Ras effector. *PLoS One* 4:e4884
- Williams-Gray CH, Foltynie T, Lewis SJ, Barker RA. 2006. Cognitive deficits and psychosis in Parkinson's disease: a review of pathophysiology and therapeutic options. *CNS Drugs* 20:477-505
- Winters BD, Bartko SJ, Saksida LM, Bussey TJ. 2007. Scopolamine infused into perirhinal cortex improves object recognition memory by blocking the acquisition of interfering object information. *Learn Mem* 14:590-6
- Winters BD, Bussey TJ. 2005. Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci* 25:4243-51
- Woodard GE, Jardin I, Berna-Erro A, Salido GM, Rosado JA. 2015. Regulators of g-protein-signaling proteins: negative modulators of g-protein-coupled receptor signaling. *Int Rev Cell Mol Biol* 317:97-183
- Woodside BL, Borroni AM, Hammonds MD, Teyler TJ. 2004. NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels mediate different aspects of acquisition and retention of a spatial memory task. *Neurobiol Learn Mem* 81:105-14
- Wu X, Wakefield JK, Liu H, Xiao H, Kralovics R, et al. 2000. Development of a novel trans-lentiviral vector that affords predictable safety. *Mol Ther* 2:47-55
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134
- Yonelinas AP. 2001. Components of episodic memory: the contribution of recollection and familiarity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:1363-74
- Yonelinas AP, Aly M, Wang WC, Koen JD. 2010. Recollection and familiarity: examining controversial assumptions and new directions. *Hippocampus* 20:1178-94
- Yoon YJ, White SL, Ni X, Gokin AP, Martin-Caraballo M. 2012. Downregulation of GluA2 AMPA receptor subunits reduces the dendritic arborization of developing spinal motoneurons. *PLoS One* 7:e49879
- Yu DF, Wu PF, Fu H, Cheng J, Yang YJ, et al. 2011. Aging-related alterations in the expression and distribution of GluR2 and PICK1 in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 497:42-5
- Zhu JJ, Esteban JA, Hayashi Y, Malinow R. 2000. Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* 3:1098-106
- Ziakopoulos Z, Tillett CW, Brown MW, Bashir ZI. 1999. Input-and layer-dependent synaptic plasticity in the rat perirhinal cortex in vitro. *Neuroscience* 92:459-72

VIII. Apéndices

1 Apéndice 1. BIOLOGÍA MOLECULAR

1.a) Electroforesis en gel de Agarosa

1.a.1) Tampón Tris-Bórico-EDTA (TBE) 5X, 1 L

REACTIVO	CANTIDAD
Tris (Sigma-Aldrich,T1503)	54 g
Ácido bórico (Sigma-Aldrich,b6768)	27,5 g
Ácido etilendiaminotetraacético EDTA (Sigma-Aldrich,E5134)	3,72 g
Agua Milli-Q	hasta 1 L

1.a.2) Gel de agarosa al 1 %

REACTIVO	CANTIDAD	
	Gel pequeño (8 calles)	Gel grande (10 calles)
Agarosa (E0301, EuRx)	0,4 g	1 g
Tampón TBE 1X * ¹	40 ml	100 ml
Bromuro de etidio (0,1 mg/ml) * ²	68 µl	170 µl

*¹ Preparado a partir del tampón TBE 5X (apéndice 1.a.1).

*² Preparado a partir de la solución stock de bromuro de etidio a 10 mg/ml (Invitrogen, 15585-011)

1.b) Amplificación en Bacterias

1.b.1) Preparación de 500 ml de medio de cultivo LB líquido y 500 ml de LB-Agar ambos con ampicilina a 100 µg/ml

REACTIVO	CANTIDAD
LB Broth Base (Invitrogen, 12780-052)	20 g
Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich, S3014)	5 g
Agua Milli-Q	hasta 1 L

Tras disolver LB y NaCl en agua Milli-Q se repartió el volumen resultante en 2 botes de 1 L (500 ml cada uno). Se añadieron a uno de ellos 7,5 g de LB-Agar (Invitrogen, 22700-025) para tener así 500 ml de medio sólido LB-Agar y 500 ml de medio LB líquido.

Los medios se esterilizaron por calor húmedo a 121 °C durante 15 min en un autoclave (sterilclav-75, Raypa) y se dejaron enfriar hasta alcanzar una temperatura de 50 °C (evitando así la solidificación). A continuación, en la campana de flujo laminar, se añadieron 500 µl de la solución stock de ampicilina a una concentración de 100 mg/ml (Sigma-Aldrich, A9393) a cada bote de 500 ml de medio de cultivo (concentración final de ampicilina: 100 µg/ml). El medio sólido LB-Agar con antibiótico se repartió en placas de Petri de 90 mm de diámetro (20-25 ml por placa), y una vez solidificado, se conservaron a 4 °C al igual que el medio LB líquido con antibiótico.

1.b.2) Transformación por choque térmico de la mezcla de ligación en células competentes

Para realizar la transformación por choque térmico se siguió el protocolo indicado en el kit *One Shot® Omni MAX™ 2 T1® Chemically Competent E.coli* (Life technologies, C8540-03). Para ello, se descongeló de forma gradual el vial que contenía 50 µl de células competentes y se añadieron 4 µl de DNA (10 pg a 100 ng) mezclándose delicadamente mediante golpes suaves. A continuación, se incubó la reacción en hielo durante 30 min y se sometieron las células a un choque térmico de 42 °C 30 s en un baño termostático sin agitación. Se incubó de nuevo la reacción en hielo durante 2 min y se añadieron 250 µl de *medio S.O.C (incluido en el kit)*. Seguidamente, se incubó 90 min a 37 °C, horizontalmente y en agitación a 225 rpm en un incubador-agitador de cultivos (*optic ivymen system*). Tras la incubación, se sembraron 20, 50 y 200 µl de la reacción de transformación resultante en 3 placas de Petri de 90 mm de diámetro con LB-Agar/ ampicilina a 100 µg/ml (apéndice 1.b.1) en un ambiente de esterilidad. Finalmente, se incubaron las placas a 37 °C durante 18 h en la estufa en posición invertida y se seleccionaron las colonias de células transformadas.

1.c) Purificación de DNA por columna

1.c.1) Purificación por PCR

Para llevar a cabo la purificación de la mezcla de reacción de PCR, se siguió el protocolo proporcionado por el kit *Mini Elute PCR purification* (Quiagen, 28004):

Preparación de la muestra: se añadieron 5 volúmenes del tampón PBI a 1 volumen de la mezcla de reacción de PCR y se mezcló suavemente por pipeteo. Por cada 50 µl de producto de PCR se añadieron 100 µl de isopropanol.

Unión del DNA: una vez aplicada la muestra a la columna *mini Elute* previamente colocada en su receptáculo, se centrifugó a 19000 x g durante 1 min en la microcentrífuga Mikro-22 (Hettich Zentrifugen) y se descartó el sobrenadante.

Lavado: se añadieron 750 µl de *Tampón PE* a la columna centrifugándose de nuevo. Se descartó el receptáculo con el sobrenadante y se colocó la columna en un tubo de 1,5 ml limpio.

Elución del DNA: tras añadir 10 µl de *tampón EB* en el centro de la membrana, se dejó reposar la columna 2 min. Finalmente se centrifugó la columna durante 1 min a 19000 x g y se almacenó a -20 °C.

1.c.2) Purificación en gel del producto de PCR

Para llevar a cabo la purificación de la banda de DNA extraída del gel, se siguió el protocolo proporcionado por el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, A9281):

Unión del DNA: se añadieron 350 µl de *tampón de unión a la membrana* (10 µl de tampón/10 mg de gel) al tubo de 1,5 ml que contenía la banda de DNA extraída. Tras agitar vigorosamente (en vortex) e incubar a 60 °C hasta disolver la banda completamente, se transfirió la mezcla a la columna *Wizard SV Minicolumn*

previamente insertada en un *tubo de recolección* y se incubó a temperatura ambiente 5 min. A continuación se centrifugó a 16000 x g durante 1 min descartándose el sobrenadante.

Lavado: tras añadir 700 µl de *solución de lavado de membrana* previamente diluida con etanol al 95 %, se centrifugó a 16000 x g durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se repitió este procedimiento pero añadiendo en este caso 500 µl. Una vez descartado el sobrenadante se volvió a centrifugar la columna a 16000 x g 1 min, y con el fin de que se evaporara todo el etanol, se colocó en un tubo de 1,5 ml estéril 1 h a 37 °C.

Elución del DNA: se añadieron 50 µl de agua libre de nucleasas, directamente sobre el centro de la membrana y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Para obtener el DNA purificado, se centrifugó la columna a 16000 x g 2 min y se conservó el DNA obtenido a -20 °C hasta su uso.

1.c.3) Reacción de miniprep

La reacción de miniprep se realizó de acuerdo con el protocolo indicado en el kit: *StrataPrep plasmid miniprep* (Agilent technologies, 400761) con algunas modificaciones.

Lisado y homogenizado: los sedimentos de bacterias se obtuvieron mediante centrifugación de alícuotas de 1 ml de medio de cultivo a 19000 x g durante 1 min en una centrífuga Mikro-22 (Hettich Zentrifugen). Para romper las membranas bacterianas y liberar así el DNA, los sedimentos se resuspendieron en 100 µl de la *solución 1* mediante vortex y pipeteo. A continuación se añadieron en primer lugar 100 µl de la *solución 2* mezclando varias veces por inversión y 250 µl de la *solución 3* mezclando también varias veces por inversión. Para poder descartar los restos celulares y así obtener el DNA recombinante, se centrifugó la mezcla a 13000 x g durante 5 min.

Unión del DNA: se recuperó el sobrenadante resultante cuidadosamente por pipeteo o decantación en una *minicolumna* previamente insertada en su *receptáculo*, se incubó a temperatura ambiente durante 1 min y se centrifugó a 19000 x g 30 s. El líquido resultante se recuperó, se volvió a pasar por la columna y se centrifugó de nuevo. A continuación, las endonucleasas se eliminaron añadiendo 650 µl de *1×nuclease-removal buffer* y centrifugando las columnas a 19000 x g durante 1 min.

Lavado: el DNA unido a la *minicolumna* se lavó añadiendo 700 µl del *tampón de lavado 2X* previamente diluido con etanol absoluto. Se volvió a centrifugar la columna de nuevo para eliminar cualquier resto del tampón de lavado. La columna se transfirió a un tubo nuevo de 1,5 ml estéril y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente para la completa evaporación de etanol.

Elución del DNA: el DNA unido a la membrana se extrajo añadiendo 50 µl de *agua libre de nucleasas* directamente sobre el centro de la misma, que se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó a 19000 x g 1 min. El DNA plasmídico purificado se almacenó a 4 °C.

1.c.4) Reacción de maxiprep

La reacción de maxiprep se realizó de acuerdo con el protocolo indicado en el kit: *Wizard® Plus Maxiprep DNA Purification System* (Promega, A7270):

Lisado y homogenizado: los sedimentos de bacterias se obtuvieron mediante la centrifugación del cultivo bacteriano en repetidas fracciones de 35 ml en un tubo de centrífuga de 50 ml (Nalgene, 3115-0050) a 5000 x g durante 10 min a temperatura ambiente en la centrífuga rotina 420 (Hettich Zentrifugen), descartando cada vez el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 10 ml de la *solución de resuspensión P1* mediante vortex y pipeteo. A continuación se añadieron 10 ml del *tampón de lisado P2*, que se mezcló suavemente por inversión y se incubó a temperatura ambiente 5 min. Se añadieron más tarde 10 ml del *tampón de neutralización P3*, mezclando suavemente por inversión hasta perder el color azul proporcionado por este reactivo, y se incubó

en hielo durante 15 min. Tras la incubación, se centrifugó el tubo a 20000 x g 30 min a 4 °C en la centrífuga Sorvall RC5C, empleando el rotor fijo SS34 y se filtró el sobrenadante, recuperándose un volumen de 25 ml aproximadamente.

Unión del DNA: mientras se filtraba el sobrenadante, se equilibró la columna añadiendo 10 ml del tampón de equilibrado QBF dejándolo caer por gravedad sobre un tubo de 50 ml que se descartó después. Una vez equilibrada, se añadió el filtrado que pasó a través de la columna por gravedad.

Lavado: se realizaron dos lavados con 30 ml del tampón de lavado QC en cada uno.

Elución del DNA: para ello se añadieron 15 ml del tampón de elución QF a la columna. A continuación se adicionaron 10,5 ml de isopropanol (Fluka, 59304) sin DNAsa a la muestra que se mezcló e incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, se centrifugó a 20000 x g durante 30 min a 4 °C en la centrífuga Sorvall RC5C, empleando el rotor fijo SS34 descartándose con mucho cuidado el sobrenadante. Se añadieron posteriormente 5 ml de etanol al 70 % estéril para resuspender el sedimento por pipeteo y vortex. La muestra se volvió a centrifugar en la centrífuga rotina 420 (Hettich Zentrifugen) a 15000 x g 10 min, descartando el sobrenadante. Tras incubar las muestras 45 min a temperatura ambiente y 15 min a 37 °C, se añadió 1 ml de agua libre de nucleasas para resuspender el DNA mediante pipeteo y vortex y se centrifugó de nuevo a 4500 x g durante 30 s. Una vez finalizada la centrifugación, se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml, se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm en el espectrofotómetro estimándose así la concentración de DNA del vector recombinante RGS14₄₁₄ que se conservó a 4°C.

1.d) Reacción de qRT-PCR

1.d.1) Extracción del RNA total

El RNA total fue aislado de la corteza visual secundaria utilizando el *RNeasy Tissue Mini kit* (Quiagen, 74124) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante:

Lisado y homogenizado: una vez descartado el RNAlater en el que estaba almacenado el tejido, se congeló la muestra en nitrógeno líquido. Tras machacar la muestra en un mortero se añadió 1ml de *QIAzol Lysis Reagent*. Esta mezcla se recogió en un tubo de 1,5 ml y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 200 µl de cloroformo, se mezcló mediante movimientos suaves durante 15 s y se incubó 2-3 min a temperatura ambiente.

Separación de las fases: la mezcla resultante se centrifugó durante 15 min a 4 °C a 12000 x g (Beckman CS-15R, rotor F2402H). Tras la centrifugación, la fase acuosa se recuperó y transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml al que se añadió en una proporción 1:1 etanol al 70 % y se agitó vigorosamente.

Unión del RNA: una vez transferida la muestra a una columna *RNeasy* previamente colocada en un tubo de 2 ml se dejó reposar 2 min. Seguidamente se centrifugó a temperatura ambiente durante 15 s a ≥ 8000 x g descartándose el sobrenadante.

Lavado: se realizó a temperatura ambiente. Tras añadir 700 µl de *Buffer RW1* a la columna, se centrifugó durante 15 s a ≥ 8000 x g y se descartó el sobrenadante. A continuación, se repitió el paso anterior pero añadiendo en este caso 500 µl de *Buffer RPE*. Seguidamente, se añadieron 500 µl de *Buffer RPE* centrifugándose durante 2 min a ≥ 8000 x g. Por último, se colocó la columna en un tubo nuevo de 2 ml y se centrifugó 1 min a máxima velocidad.

Elución del RNA: para este último paso, se colocó la columna en un tubo nuevo de 1,5 ml y se añadieron 30 µl de *RNase-free water* o *RNA eluate* directamente sobre la membrana. Tras reposar 2 min se centrifugó la columna 1 min a ≥ 8000 x g a temperatura ambiente. El RNA obtenido se almacenó a -80 °C.

1.d.2) Determinación de la concentración óptima de cebadores

La concentración óptima de cebadores sería a la cual:

- i) Se obtiene un menor Ct (ciclo umbral) y un mayor ΔRn (Incremento de la señal durante la amplificación comparada con la línea base). Los valores de Ct y ΔRn los proporciona el programa del aparato 7500 V2.0.6, siendo Ct el número de ciclos requeridos para que la señal de fluorescencia cruce un umbral fijado por encima de la línea base y ΔRn el incremento de la señal de fluorescencia, específico del producto de PCR acumulado.
- ii) Se comprueba la presencia de un solo producto de PCR específico en la reacción mediante la curva de disociación.
- iii) Se comprueba la obtención de una sola banda con el tamaño correcto de amplicón mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

2 Apéndice 2. CULTIVOS CELULARES

2.a) Tratamiento de frascos de cultivo con gelatina al 0,3 % (p/v)

Tras preparar una solución de gelatina al 0,3 % añadiendo 1,5 g de gelatina (Sigma-Aldrich, G-9391) a 500 ml de agua destilada y esterilizando la mezcla obtenida mediante calor húmedo en un autoclave, se añadió la suficiente cantidad de gelatina para cubrir la superficie del frasco y se incubó durante 15-20 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se retiró la gelatina excedente.

2.b) Congelación y descongelación de células

2.b.1) Congelación de células

Con el fin de crear un *stock* de las líneas celulares, se procedió a su congelación en nitrógeno líquido (-196 °C). Partiendo de un cultivo celular al 80-90% de confluencia, las células se disociaron y contaron en una cámara de Neubauer con azul trípango (apéndice 2.c). Se resuspendieron en el volumen de medio de congelación filtrado (90 % de medio completo sin antibiótico y 10 % de DMSO (Sigma Aldrich, D8418)) necesario para generar una suspensión de 3×10^6 células viables/ml y se repartieron en crioviales de 2 ml (Nunc, 363401) que se conservaron en nitrógeno líquido.

2.b.2) Descongelación de células

El vial comercial de cada línea celular (HT1080 ó 293T) se sometió a una temperatura de 37 °C en el baño termostático. A continuación, tras limpiar el exterior del vial con una solución de etanol al 70 %, se vertió el contenido de éste en un tubo estéril de 15 ml con 10 ml de medio completo en una campana de flujo laminar. El tubo se centrifugó a 150-200 x g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 2 ml de medio completo sin antibiótico y se sembró en un frasco de 75 cm² (Nunc, 156499) que contenía 10 ml de medio completo sin antibiótico (atemperado previamente a 37 °C durante 15 min).

2.c) Realización de un subcultivo

Los subcultivos (pases) de las células se realizaron cada 3-4 días tras alcanzar una confluencia del 80 % - 90 % según el siguiente protocolo:

Tripsinización: una vez retirado el medio de cultivo y con el fin de lavarlo se añadió PBS pH7,4 (Gibco, 10010) moviendo suavemente el frasco durante aproximadamente 1 min. Tras retirar el PBS se añadió la solución tripsina-EDTA (Gibco, 25200-072), 2 ml para frascos de 75 cm² (Nunc, 156499) y 5 ml en frascos de 175 cm² (Nunc, 159910). Se incubó la placa a 37 °C durante 5 min y se inactivó la tripsina al añadir 3 o 5 ml (dependiendo del frasco) de medio completo (con suero). Una vez neutralizada la enzima, se recuperó el medio en un tubo de 15 ml mediante una pipeta serológica y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min en la centrífuga Labofuge 400 (Heaeus, rotor 8179) para finalmente descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 10 ml de medio completo mediante pipeteo.

Contaje celular: se determinó la densidad y viabilidad celular mediante el método de tinción con azul tripano 0,4 % (Sigma-Aldrich, T8154) en una cámara de Neubauer (Bright-line).

Siembra: se sembró el volumen de resuspensión celular necesario para obtener el volumen final deseado en un frasco de 75 cm² con 10 ml de medio completo, o en un frasco de 175 cm² con 15 ml de medio completo. El volumen a sembrar dependió de la línea celular utilizada (descrito en el manual de la línea celular).

2.d) Transfección

Tras 24 h desde la siembra de 4.5×10^6 células 293T por placa (células al 80 % de confluencia) se llevó a cabo la transfección de estas células utilizando el kit *Lenti-XTM Packaging System* (Clontech, 631247) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Para ello, por cada muestra de transfección (placa), se añadieron los reactivos indicados en la siguiente tabla para dos tubos diferentes (los componentes de cada tubo se mezclaron pipeteando con suavidad arriba y abajo):

Tubo 1	Tubo 2
557 µl Xfect Reaction Buffer (Clontech, 631317)	592,5 µl Xfect Reaction Buffer (Clontech, 631317)
36 µl Lenti-X HTX Packaging Mix (Clontech, 631260)	7,5 µl Xfect Polymer (Clontech, 631317)
7 µl Lenti-X Vector DNA (1 µg/µl)	600 µl volumen total
600 µl volumen total	

A continuación se añadió el contenido del tubo 2 al tubo 1 mezclando bien por pipeteo y se incubó la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la formación de nanopartículas. Pasados los 10 min de incubación, se añadieron 1200 µl de la mezcla a cada placa de cultivo, gota a gota por toda la superficie de forma homogénea, y se incubó a 37 °C durante 24 h. Tras la incubación, se reemplazó el medio de transfección de las placas por medio completo sin antibiótico para las células 293T y se volvió a incubar a 37 °C durante 48 h para la producción de lentivirus. Transcurrido el tiempo, se recogieron los sobrenadantes de las placas que contenían los lentivirus en 2 tubos de 50 ml (30 ml en cada uno), manteniendo los sobrenadantes en hielo y se centrifugaron a 500 x g a 4 °C 15 min en la centrífuga Beckman CS-15R (Rotor S4180). A continuación, se aspiró el sobrenadante con una jeringa de 10 ml (BD DiscarditTM, 309110) y una aguja de punta roma de 18 G (BD, 305180) y se procedió a su filtración con la ayuda de un filtro de 0,45 µm (Sarstedt, 831826) manteniendo en todo momento el sobrenadante que contenía los lentivirus a 4 °C.

2.e) Tinción de las colonias celulares con cristal violeta

Para llevar a cabo esta tinción, se retiró el medio de los pocillos de la placa sembrada con las células HT1080 infectadas con el stock de lentivirus y se realizaron dos lavados con PBS pH7,4 (Gibco, 10010) añadiendo 1 ml por pocillo en cada lavado. Tras retirar el PBS, se añadió en cada pocillo 1 ml de cristal violeta (Sigma, C3886) al 1 % en 10 % de etanol (JT Baker, 8025) incubándose 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el colorante de los pocillos y se lavaron con 1 ml de PBS 3 veces. Tras retirar el PBS se contaron las colonias.

3 Apéndice 3. TEST DE ORM

3.a) Objetos para el test de ORM de rata



3.b) Objetos para el test de ORM de ratón



4 Apéndice 4. HISTOLOGÍA

4.a) Tampones y soluciones

4.a.1) Tampón fosfato (PB) 0,4 M pH 7,4 (para 1L)

REACTIVO	CANTIDAD
Agua Milli-Q	hasta 1 L
Hidrógenofosfato disódico HNa₂O₄P 2H₂O (Fluka, 71645)	53,4 g
Dihidrógenofosfato sódico NaH₂PO₄·H₂O (Panreac, 131965)	13,8 g

Ajustar el pH a 7,4 y conservar a temperatura ambiente.

4.a.2) Tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,4 (para 1L)

REACTIVO	CANTIDAD
Agua Milli-Q	Hasta 1 L
Cloruro sódico NaCl (Panreac, 131659)	9 g
PB 0,4 M a pH 7,4 (apéndice 4.a.1)	250 ml

Ajustar el pH a 7,4 y conservar a temperatura ambiente.

4.a.3) Solución fijadora PLP (paraformaldehído 4%, L-lisina 75 mM y Meta-periodato 10 mM) en PB 0,1 M, pH 7,4 (para 1L)

REACTIVO	CANTIDAD
Agua Milli-Q	750 ml
Paraformaldehído (CH₂O)_n (Merck, 1.04005)	40 g
L-Lisina monoclóhidrato C₆H₁₄N₂O₂HCl (Sigma-Aldrich, 62929)	13,7 g
Metaperiodato sódico INaO₄ (Sigma, 30323)	2,14 g
PB 0,4 M, pH 7,4 (apéndice 4.a.1)	250 ml

Para la preparación de esta solución, se diluyó el paraformaldehído en 500 ml de agua Milli-Q previamente calentada a 60 °C (añadiéndose unas gotas de NaOH para su completa disolución). Se filtró la solución resultante con papel de filtro y se enrasó hasta 750 ml con agua Milli-Q. Por otro lado, se diluyeron la lisina y el meta-periodato en 200 ml de PB 0,4 M pH 7,4 y se filtró la solución resultante con papel de filtro enrasando hasta 250 ml con PB 0,4 M pH 7,4. Por último, se añadieron los 250 ml de la solución de lisina y meta-periodato a los 750 ml de solución de paraformaldehído en agitación.

4.a.4) Solución de sacarosa al 30 % y azida al 0,02 % en PBS 0,1 M (para 100 ml)

Para la preparación de esta solución, se disolvieron 30 g de sacarosa (Panreac, 131621) en PBS 0,1 M a pH 7,4 (apéndice 4.a.2) y se enrasó hasta un volumen final de 100 ml. Se retiraron 200 µl de la solución para añadir 200 µl de una solución de azida sódica al 10 % (Sigma-Aldrich, S2002) conservándose la solución resultante a 4 °C.

4.a.5) Medio de montaje para inmunohistoquímica fluorescente (Medio DABCO)

Para preparar este medio de montaje, se diluyó el DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2]-octano) (Sigma-Aldrich, D-2522) al 3 % en una mezcla PBS 0,1 M pH 7,4 (apéndice 4.a.2) y glicerol (141339, Panreac) previamente preparada en una proporción 1:1 manteniendo la solución resultante a 4 °C y en oscuridad.

4.b) Portaobjetos gelatinizados

-Preparación de la solución de Gelatina

REACTIVO	CANTIDAD
Agua Milli-Q	600 ml
Gelatina (Panreac, 142060)	3 g
Sulfato de cromo (III) y potasio (Panreac, 131284)	0,3 g

Para preparar la solución de gelatina, se disolvió esta última en agua Milli-Q previamente calentada a 60 °C y se añadió el sulfato de cromo (III) y potasio hasta su completa disolución.

-Gelatinizado de los portaobjetos

Previo al gelatinizado, se desengrasaron con una mezcla de alcohol absoluto:éter (1:1) al menos un día, dejándose secar 2 min a temperatura ambiente tras el tratamiento. A continuación se sumergieron en la solución de gelatina previamente preparada durante 1 min y se repitió esta operación 5 veces más durante unos segundos. Finalmente se dejaron secar en la estufa a 37 °C 48 h. Estos portaobjetos son viables al menos dos meses desde su preparación.

4.c) Fijación por perfusión cardíaca y extracción del cerebro fijado

Una vez anestesiado el animal (rata) con la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (Eutanax 200 mg/ml, Fatro) a una dosis de 120 mg/Kg, los animales se perfundieron transcárdialmente. Para acceder al corazón, se practicó una incisión en el abdomen y se abrió la cavidad torácica exponiendo el órgano. Se introdujo una aguja en el ventrículo izquierdo y se abrió la aurícula derecha formando así un circuito abierto. Utilizando una bomba de perfusión (Cole parmer) se inyectó lentamente PBS 0,1 M, pH 7,4 (apéndice 4.a.2) durante 15 min a un flujo de 10 ml/min hasta lavar completamente el sistema circulatorio de sangre. A continuación, se inyectaron 350 ml de una solución fijadora de PLP en PBS 0,1 M, pH 7,4 (apéndice 4.a.3). Finalmente, se extrajo cuidadosamente el cerebro y se post-fijó por inmersión en PLP durante una noche a 4 °C.

4.d) Crioprotección y congelación

Una vez post-fijados, los encéfalos se lavaron con PBS (10 min, 3 veces) para eliminar los restos de PLP y se crioprotegieron mediante inmersión en una solución de sacarosa al 30 % y azida sódica al 0,02 % en PBS (apéndice 4.a.4) a 4 °C para evitar daños en la estructura del tejido durante el proceso de congelación. A continuación, los cerebros se congelaron utilizando nieve carbónica y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

4.e) Obtención de las secciones

Los cerebros congelados se cortaron en secciones coronales de 30 µm de grosor en un microtomo de congelación (Leica CM-1325), almacenándose de forma seriada según la técnica de *free-floating* en pocillos que contenían una solución de PBS 0,1 M y 0,02 % de azida sódica. Se seleccionaron los cortes pertenecientes a las zonas de interés (área V2, corteza perirrinal o corteza frontal) y se distribuyeron en 6 series (una serie en cada pocillo) de tal forma que dentro de una serie, los cortes consecutivos distaban entre sí 180 µm. Las placas que contenían las secciones seriadas se almacenaron a 4 °C durante varios meses, renovando regularmente el tampón PBS con azida sódica.

4.f) Marcaje inmunofluorescente simple para microscopía convencional de fluorescencia para RGS14

Previo a la incubación con avidina y biotina, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno en PBS 0,1 M (apéndice 4.a.2), en agitación y a temperatura ambiente. Se empleó el kit de bloqueo de avidina-biotina (Vector Laboratories, SP-2001) incubándose los cortes durante 30 min en cada solución, (con un paso intermedio de un lavado de 10 min en PBS) en agitación y a temperatura ambiente. Tras estas incubaciones se realizaron 3 lavados con PBS siguiendo el procedimiento anterior y se incubaron los cortes con el anticuerpo primario policlonal de conejo frente a la proteína RGS14 (Novus biological, NBP1-31174) a una dilución 1:500 (diluido en PBS, con 0,3 % tritón X-100 (Sigma-Aldrich, 9002-93-1) y 0,1 % azida sódica) durante toda la noche a 4 °C y en agitación.

Tras eliminar el exceso de anticuerpo primario lavando con PBS, los cortes se incubaron en oscuridad, a temperatura ambiente y en agitación 2 h 30 min con el anticuerpo secundario Alexa fluor 488, IgG anti-IgG de conejo desarrollado en cabra (Life technologies, A11008) a una dilución 1:1000 (diluido en PBS 0,1 M con 0,3 % tritón X-100 y 0,1 % azida sódica). El exceso de anticuerpo secundario se eliminó con PBS (3 lavados).

-Montaje: Por último, las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados (apéndice 4.b) y se dejaron secar durante toda la noche. Al día siguiente, se cubrieron usando como medio de montaje PBS-glicerina (1:1) y 3 % de 1,4-diazabicyclo [2.2.2.]-octano (DABCO) (apéndice 4.a.5). Las secciones se analizaron en el microscopio CTR Mic DM IRE2 (Leica).

5 Apéndice 5. PROTEÓMICA

5.a) Tampones y soluciones

5.a.1) Tampón Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4 , para 50 ml

En 50 ml de Agua Milli-Q se añadieron 0,06 g de Tris (Sigma-Aldrich, T1503) y se ajustó el pH a 7,4 con HCl (T-Bakes, 6081).

5.a.2) Tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, para 50 ml

En 50 ml de Agua Milli-Q se añadieron 3,02 g de Tris (Sigma-Aldrich, T1503) y se ajustó el pH a 6,8 con HCl (T-Bakes, 6081).

5.a.3) Tampón de carga (1X) , para 8 ml

Tris-HCl 60 mM pH 6.8, SDS al 2 %, glicerol al 10 %, 2 β -mercaptoetanol al 5 % y azul de bromofenol al 0,002 %:

REACTIVO	CANTIDAD
Agua Milli-Q	3,88 ml
2- β mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, M7154)	0,4 ml
Glicerol al 99% (Sigma-Aldrich, G6279)	0,8 ml
Dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% (Sigma-Aldrich, L3771)	1,6 ml
Tris-HCL 0,5M, pH 6,8 (apéndice 5.a.2)	1 ml

5.a.4) Tampón Tris-Glicina-SDS (TGS) (5X), para 1 L

12,5 mM Tris, 96 mM glicina, 0,5 % SDS

REACTIVO	CANTIDAD
Agua Milli-Q	hasta 1 L
Glicina (Sigma-Aldrich, G7126)	72 g
Dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich, L3771)	5 g
Tris (Sigma-Aldrich, T1503)	15 g

5.a.5) Tampón PBS (10X), para 1 L

REACTIVO	CANTIDAD
Agua Milli-Q	hasta 1 L
Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich, S3014)	72,2 g
Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) (Merck-Millipore, 104873)	4,3 g
Fosfato de sodio dibásico (Na₂HP0₄ 2H₂O) (Fluka, 71645)	19 g

5.a.6) Tampón PBS-Tween 0,1% (TPBS), para 1 L

REACTIVO	CANTIDAD
Agua Milli-Q	900 ml
Tampón PBS (10X) (apéndice 5.a.5)	100 ml
Tween (Sigma-Aldrich, 9005-64)	1 ml

5.b) Determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Lowry

La concentración de proteínas de las muestras se estimó mediante el método colorimétrico de Lowry (Lowry et al 1951) siguiendo el protocolo descrito a continuación:

→Reactivos y soluciones

Solución stock de albúmina de suero bovina a 500 µg/ml, para 10 ml: se disolvieron 5 mg de BSA (Sigma-Aldrich, A3059) en 10 ml de agua Milli-Q y se prepararon alícuotas de 500 µl que se conservaron a -80 °C.

Solución de carbonato sódico al 2 %, para 50 ml: se disolvió 1 g de carbonato sódico anhidro (Na₂CO₃, Panreac, 131648.1210) en 50 ml de agua Milli-Q y se conservó la solución a 4 °C.

Solución de sulfato de cobre al 1 %, para 50 ml: se disolvieron 0,5 g de cobre (II) sulfato anhidro (CuSO₄, Panreac, 122726.1209) en 50 ml de agua Milli-Q conservándose la solución a 4 °C.

Solución de tartrato sódico al 2 %, para 50 ml: se disolvió 1g de tartrato sódico anhidro (Na₂C₄H₄O₆, Panreac, 121720.1210) en 50 ml de agua Milli-Q y se conservó la solución a 4 °C.

Solución de hidróxido sódico 1,2 N, para 50 ml: se disolvieron 2,4 g de hidróxido sódico (Panreac, 1316877787.1211) en 50 ml de Agua Milli-Q conservándose la solución a 4 °C.

Reactivo alcalino de cobre (ACR): se mezclaron en una proporción 100:1:1 las soluciones Na₂CO₃ al 2 %:Na₂C₄H₄O₆ al 2 %:CuSO₄ al 1 %.

Reactivo fenol de Folin-Ciocolteus, 2 N (Sigma-Aldrich, F9252)

→Procedimiento

A partir de una solución stock de BSA a 500 µg/ml, se preparó la curva patrón (n = 3 para cada concentración) tal y como se muestra en la tabla:

Tubo	Volumen de BSA 500 µg/ml (µl)	Volumen de agua Milli-Q (µl)	[BSA] (µg/ml)
T1	0	75	0
T2	5	75	33
T3	10	65	67
T4	20	55	133
T5	30	45	200
T6	40	35	267

Una vez preparadas las muestras de la curva patrón, se prepararon 2 diluciones (1/5 y 1/10) por cada tratamiento a estudio (n = 2). Como blanco, se utilizaron las diluciones 1/5 y 1/10 del tampón de homogenizado Tris-HCl 0,01 M pH 7,4 (apéndice 5.a.1) en agua Milli-Q.

A cada muestra se le añadieron 75 µl de NaOH 1,2 N mezclándose mediante una ligera agitación en vortex. Tras preparar el volumen necesario de ACR, se adicionaron 750 µl de esta solución a cada tubo, se mezcló mediante una ligera agitación en vortex y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadieron 75 µl de reactivo fenol de Folin-Ciocolteus 2 N:agua Milli-Q en una proporción 1:1 mezclándose vigorosamente con vortex y se incubó 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro (S30, Boeco).

6 Apéndice 6. ELECTROFISIOLOGÍA

6.a) Líquido cefalorraquídeo artificial modificado (mACSF), para 1 L

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mM)	CANTIDAD (g)
Sacarosa (Sigma-Aldrich, S0389)	189	64,69
Glucosa (Fluka, G0350500)	10	1,80
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃) (Sigma-Aldrich, S5761)	26	2,18
Cloruro de potasio (KCl) (Sigma-Aldrich, P9541)	3	0,22
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄) (Sigma-Aldrich, M2643)	5	0,60
Cloruro de calcio (CaCl ₂) (Sigma-Aldrich, C5670)	0,1	0,011
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄) (Sigma-Aldrich, S3139)	1,25	0,15

6.b) Líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) , para 1 L

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mM)	CANTIDAD (g)
Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich, S3014)	124	7,25
Cloruro de potasio (KCl) (Sigma-Aldrich, P9541)	3	0,22
Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) (Sigma-Aldrich, S5761)	26	2,18
Fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄) (Sigma-Aldrich, S3139)	1,4	0,17
Sulfato de magnesio (MgSO₄) (Sigma-Aldrich, M2643)	1	0,12
Glucosa (Fluka, G0350500)	10	1,8
Cloruro de calcio (CaCl₂) (Sigma-Aldrich, C5670)	2	0,22



Ph.D. Thesis, Mariam Al-Masmudi Martín.