

Diss. ETH N° 14858

# **The Involvement of Calcineurin and Protein Phosphatase 1 in Learning and Memory**

A dissertation submitted to the  
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

For the degree of  
Doctor of Natural Sciences

Presented by

**Ursula Haditsch**

Biochemist  
University of Zurich

Born December 19<sup>th</sup> 1973  
Citizen of Austria

Accepted on recommendation of

Prof. Dr. Isabelle Mansuy, examiner  
Prof. Dr. Martin Schwab, coexaminer  
Dr. Verdon Taylor, coexaminer

2002

## Summary

For decades cognitive psychologists and neurobiologists have been trying to understand the mechanisms that underlie learning and memory. Initial studies in human patients with brain lesions made it apparent that memory is not a unitary faculty of mind, but can be classified into at least two different categories: declarative memory that relates to the knowledge of fact and events (chapter 1.1.1 on page 8), and procedural memory relating to the knowledge of “how to do something” (chapter 1.1.2 on page 9). By studying these two independent memory processes, research has focused on important aspects of memory storage: its anatomical basis and its mechanisms of storage. The areas of the brain where memories are stored are being resolved in human using positron emission tomography (PET) and functional magnetic resonance imaging (fMRI), while the storage mechanisms are mainly being studied using animal models and genetic approaches. Recently, methods for modifying individual genes in mice have become available and have proven instrumental for exploiting the mouse as a mammalian model to study the mechanisms of memory storage. Similarly to human, mice can learn and remember spatial information or objects, two forms of memory that require the hippocampus and the medial temporal lobe. Genetic approaches such as gene inactivation or overexpression have helped gain insight into the molecular pathways that underlie these forms of memory. Multiple pathways have been implicated in their regulation, one of which involves protein kinases and protein phosphatases and the balance between the two (chapter 1.1.6 on page 14).

Previous studies have shown that altering the balance between kinases and phosphatases perturbs learning and memory. For example, mice deficient for the  $\alpha$ -subunit of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase (CaMKII), one of the most abundant kinases in the brain, have impaired spatial learning and memory (Giese et al., 1998; Silva et al., 1992). Similar studies in which the activity of the protein kinase A (PKA) was reduced also revealed deficits in memory (Abel et al., 1997), indicating that kinases are required for cognitive functions. Equivalent impairments can be induced by increasing the activity of phosphatases, in particular, the serine/threonine phosphatase calcineurin (Mansuy et al., 1998a).

This suggests that a shift of the balance between kinases and phosphatases towards predominant phosphatase activity affects cognitive functions.

Since it has been proposed that PKA and calcineurin oppose each other by competing for specific phosphorylation/dephosphorylation sites (Mansuy et al., 1998a), we were interested in investigating whether inhibiting calcineurin or the downstream phosphatase PP1 would lead to improved learning and memory. The main goal of my thesis was to address this question and try to understand the role of calcineurin and PP1 in learning and memory. For this purpose, transgenic mice were generated that express an inhibitor of calcineurin or PP1 in an inducible manner using the reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA) system (Gossen et al., 1995; Mansuy et al., 1998b). The rtTA system offers several advantages: a) the expression of the calcineurin inhibitor (auto-inhibitory domain of the A $\alpha$ -subunit of calcineurin) or the PP1 inhibitor (constitutively active form of inhibitor-1) is spatially restricted to forebrain neurons, because rtTA expression is under the control of the CaMKII $\alpha$  promoter (Mayford et al., 1996), b) the inhibitors are only expressed when the tetracycline analog doxycycline is administered to the mice through the food, c) the inhibition is reversible and can be suppressed by doxycycline withdrawal.

Our results show that the inhibition of calcineurin or PP1 leads to significant enhancement of short- and long-term memory in the object recognition task (Vnek and Rothblat, 1996) and that this enhancement can be reversed by suppressing transgene expression. A facilitation of spatial learning and memory was also observed on the Morris water maze (Morris, 1981) suggesting that mutant mice expressing the calcineurin or PP1 inhibitor retained spatial information more efficiently than controls. We have shown that the enhancement in learning and memory in mice expressing the PP1 inhibitor is mediated in part by increased phosphorylation of downstream targets of PP1 including CaMKII, the GluR1 subunit of the AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) receptor and cyclic AMP responsive element-binding protein (CREB, chapter 3 on page 70). The improvement in memory after calcineurin inhibition was paralleled by an increased persistence of long-term potentiation (LTP) in awake animals suggesting a correlation between the enhancement in synaptic plasticity and memory storage (chapter 1 on page 45). Strikingly, learning and memory was also largely enhanced by PP1 inhibition in aged mutant mice (15-18 month), and in contrast to control animals, memory did not decline. These results suggest that forgetting in ageing might be prevented by suppressing phosphatase activity. Overall the results of my thesis work outline the importance of the balance between kinases and phosphatases in the regulation of learning and memory. They open new perspective for potential therapeutic treatment of memory loss.

## References

- Abel, T., Nguyen, P. V., Barad, M., Deuel, T. A., Kandel, E. R., and Bourchouladze, R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88, 615-626.
- Giese, K. P., Fedorov, N. B., Filipkowski, R. K., and Silva, A. J. (1998). Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 279, 870-873.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.
- Mansuy, I. M., Mayford, M., Jacob, B., Kandel, E. R., and Bach, M. E. (1998a). Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell* 92, 39-49.
- Mansuy, I. M., Winder, D. G., Moallem, T. M., Osman, M., Mayford, M., Hawkins, R. D., and Kandel, E. R. (1998b). Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron* 21, 257-265.
- Mayford, M., Baranes, D., Podsypanina, K., and Kandel, E. R. (1996). The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13250-13255.
- Morris, R. G. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* 12, 239-261.
- Silva, A. J., Stevens, C. F., Tonegawa, S., and Wang, Y. (1992). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257, 201-206.
- Vnek, N., and Rothblat, L. A. (1996). The hippocampus and long-term object memory in the rat. *J Neurosci* 16, 2780-2787.

## Zusammenfassung

Seit Jahrzehnten versuchen Psychologen und Neurobiologen die Mechanismen zu verstehen, die dem Lernen und dem Gedächtnis zugrunde liegen. Anfängliche Studien von Patienten mit Gehirnläsionen haben gezeigt, dass das Gedächtnis nicht aus einer einzigen Geistesfakultät besteht, sondern in mindestens zwei verschiedenen Kategorien unterteilt werden kann: Deklaratives Gedächtnis, welches das Wissen von Fakten und Ereignissen beinhaltet (Kapitel 1.1.1 auf Seite 8) und prozedurales (implizites) Gedächtnis, welches das Wissen "wie man etwas macht" umfasst (Kapitel 1.1.2 auf Seite 9). Durch die Erforschung dieser zwei unabhängigen Formen von Gedächtnis hat sich die Wissenschaft auf wichtige Aspekte der Gedächtnisspeicherung fokussiert: auf die anatomischen Zentren und die grundlegenden, molekularen Mechanismen. Die Strukturen des Gehirns, die für die Gedächtnisspeicherung zuständig sind, werden im Menschen mit Positronenemissionstomographie (PET) und mit funktioneller Kernspinresonanz-Tomographie (fMRI) aufgeklärt. Die molekularen Mechanismen der Speicherung werden hauptsächlich mit Hilfe genetisch veränderter Tiere untersucht. Seit kurzem sind Technologien für die Veränderung von einzelnen Genen in Mäusen vorhanden, die es ermöglichen die Maus als Modellsystem für die Studie der Gedächtnisspeicherung zu verwenden. Ähnlich wie Menschen können Mäuse lernen, sich räumliche Anordnungen oder Objekte zu merken. Genetische Veränderungen, wie zum Beispiel Geninaktivierung oder Überexpression haben dazu beigetragen, einen Einblick in die molekularen Mechanismen, die diesen Formen von Gedächtnis zugrunde liegen, zu bekommen. Viele verschiedene Mechanismen sind in die Regulierung verwickelt, einer davon beinhaltet Proteinkinasen und Proteinphosphatasen und das Gleichgewicht zwischen den beiden (Kapitel 1.1.6 auf Seite 14).

Frühere Studien haben gezeigt, dass eine Veränderung des Gleichgewichts zwischen Kinasen und Phosphatasen zu Störungen im Lernen und Gedächtnis führen kann. Beispielsweise zeigen Mäuse, denen die  $\alpha$ -Untereinheit der Kalzium/Calmodulin abhängigen Kinase (CaMKII) fehlt, einer der häufigsten vorkommenden Kinase im Gehirn, ein schlechteres räumliches Lernen und Gedächtnis (Giese et al., 1998; Silva et al., 1992). Ähnliche Untersuchungen, in denen die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) reduziert

wurde, brachten auch Gedächtnisverschlechterungen zum Vorschein (Abel et al., 1997), was darauf hinweist, dass Kinasen für die geistige Funktion benötigt werden. Äquivalente Verschlechterungen können durch die Erhöhung der Phosphatasenaktivität erzielt werden, im besonderen durch die Serin/Threonin Phosphatase "Calcineurin" (Mansuy et al., 1998a). Diese Studien legen nahe, dass eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Kinasen und Phosphatasen in Richtung Phosphatasen dem Gedächtnis schadet.

Nachdem vorgeschlagen worden war, dass sich PKA und Calcineurin gegenseitig opponieren, indem sie um spezifische Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsstellen konkurrieren (Mansuy et al., 1998a), waren wir daran interessiert herauszufinden, ob die Inhibierung von Calcineurin oder der in der Kaskade darunterliegenden Proteinphosphatase 1 (PP1) zur Verbesserung von Lernen und Gedächtnis führen würde. Das Hauptziel meiner Doktorarbeit war es, diese Fragen zu beantworten und die Rolle von Calcineurin und PP1 im Lernen und Gedächtnis zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden transgene Mäuse generiert, die induziert einen Inhibitor für Calcineurin oder PP1 exprimieren sollten. Die Induzierbarkeit wird durch die Verwendung des reversen Tetracyclin-kontrollierten Transaktivatorsystem (rtTA) erzielt (Gossen et al., 1995; Mansuy et al., 1998b). Das rtTA System hat verschiedene Vorteile: a) die Expression des Calcineurin Inhibitors (auto-inhibitorische Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit von Calcineurin) oder des PP1 Inhibitors (konstitutiv aktive Form des Inhibitor-1) ist auf spezielle Regionen im Gehirn beschränkt, da rtTA unter der Kontrolle des CaMKII $\alpha$  Promoters steht (Mayford et al., 1996), b) die Inhibitoren werden nur exprimiert, wenn das Tetracyclinanalog Doxycycline den Mäusen gefüttert wird, c) die Inhibierung ist reversibel und kann durch den Entzug von Doxycycline unterdrückt werden.

Unsere Resultate zeigen, dass die Inhibierung von Calcineurin und PP1 zu einer signifikanten Erhöhung des Kurz- und Langzeitgedächtnisses im Objekterkennungstest führt (Vnek and Rothblat, 1996), und dass diese Verbesserung durch die Unterdrückung der Expression reversibel ist. Eine Steigerung des räumlichen Lernens und Gedächtnisses konnte auch im Morris Wasserbecken (Morris water maze, Morris, 1981) beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass Mäuse mit Calcineurin oder PP1 Inhibierung räumliche Informationen dauerhafter speichern als Kontrollmäuse. Wir haben gezeigt, dass die Verbesserung des Lernens und des Gedächtnisses teilweise durch die erhöhte Phosphorylierung von PP1 Substraten, wie CamKII, der GluR1 Untereinheit des AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) Rezeptors und des Transkriptionsfaktors CREB (cyclic AMP responsive element-binding protein) gewährleistet wird (Kapitel 3 auf Seite 70). Die Leistungssteigerung in Mäusen mit Calcineurin Inhibierung geht mit einer vermehrten Langzeitpotenzierung (LTP) einher, was auf eine Korrelation zwischen der erhöhten synaptischen Plastizität und der Gedächtnisspeicherung hindeutet (Kapitel 2 auf Seite 45). Bermerkenswerterweise ist das Lernen und das Gedächtnis durch die Inhibierung von PP1

auch im Alter von Mäusen (15-18 Monate) verbessert, und im Gegensatz zu den Kontrollmäusen ist kein Gedächtnisverlust aufgetreten. Diese Resultate deuten darauf hin, dass das Vergessen im Alter möglicherweise vermeidbar wäre, wenn die Phosphatasenaktivität unterdrückt werden würde. Gesamthaft gesehen heben die Resultate meiner Doktorarbeit die Bedeutsamkeit des Gleichgewichtes zwischen Kinasen und Phosphatasen für das Lernen und das Gedächtnis hervor. Sie öffnen neue Perspektiven für mögliche Behandlungen von Gedächtnisverlust.

## References

- Abel, T., Nguyen, P. V., Barad, M., Deuel, T. A., Kandel, E. R., and Bourchouladze, R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88, 615-626.
- Giese, K. P., Fedorov, N. B., Filipkowski, R. K., and Silva, A. J. (1998). Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 279, 870-873.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.
- Mansuy, I. M., Mayford, M., Jacob, B., Kandel, E. R., and Bach, M. E. (1998a). Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell* 92, 39-49.
- Mansuy, I. M., Winder, D. G., Moallem, T. M., Osman, M., Mayford, M., Hawkins, R. D., and Kandel, E. R. (1998b). Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron* 21, 257-265.
- Mayford, M., Baranes, D., Podsypanina, K., and Kandel, E. R. (1996). The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13250-13255.
- Morris, R. G. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* 12, 239-261.
- Silva, A. J., Stevens, C. F., Tonegawa, S., and Wang, Y. (1992). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257, 201-206.
- Vnek, N., and Rothblat, L. A. (1996). The hippocampus and long-term object memory in the rat. *J Neurosci* 16, 2780-2787.