

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis de la heterogeneidad del reciclamiento vesicular y  
mecanismos implicados en su regulación. Estudio en un  
modelo de X-Frágil**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Alberto Rampérez Martín**

Directora

**Magdalena Torres Molina**

Madrid  
Ed. electrónica 2019

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Veterinaria**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis de la heterogeneidad del reciclamiento vesicular y mecanismos implicados en su regulación. Estudio en un modelo de X-Frágil**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**D. Alberto Rampérez Martín.**

Directora y Tutora de la Tesis:

**Magdalena Torres Molina**



**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Veterinaria**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**Análisis de la heterogeneidad del reciclamiento vesicular y  
mecanismos implicados en su regulación. Estudio en un  
modelo de X-Frágil**

Memoria presentada por: D. Alberto Rampérez Martín para  
optar al grado de Doctor.

Directora y Tutora de la Tesis: Magdalena Torres Molina

Vº Bº Directora:

Magdalena Torres Molina



El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

El autor del trabajo lo ha realizado mediante el disfrute de un contrato de investigación pre-doctoral para la Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), BES-2013-065843 y un contrato de personal de apoyo a la investigación financiado por el proyecto UCM-Santander PR41/17-21030.

La financiación requerida para el desarrollo del presente trabajo ha sido proporcionada por los siguientes proyectos:

- MINECO BFU2012-32105
- PR41/17-21030: PROYECTOS UCM-SANTANDER 2017
- RD12/0014/0003 (Redes. Instituto de salud Carlos III)
- MINECO BFU2017-83292-R



## Agradecimientos

*Cuando hace ya 6 años llegué por primera vez a este departamento no podía imaginar lo mucho que iba a marcar mi vida en lo sucesivo. Aquí encontré mucho más que unos meros compañeros de trabajo, profesores y directores de tesis. Pude ver personificadas cualidades tan loables como el entusiasmo por la ciencia, el afán de conocimiento, la perseverancia y el compañerismo más solidario. Un caldo de cultivo tan motivador que han hecho de estos años una experiencia única y que solo puedo por menos que agradecer.*

*En primer lugar, quiero comenzar agradeciendo el fruto de este trabajo a Magdalena, mi directora de tesis. Gracias en primer lugar por brindarme la posibilidad de haber dedicado estos años a la investigación en un ambiente tan enriquecedor. Gracias también por el mucho trabajo que has dedicado a mi formación, no solo desde tu despacho sino también en la poyata al pie del cañón. Gracias por mostrarme el resultado del esfuerzo y la perseverancia. Agradecerte también en lo personal el apoyo y motivación que tan necesarios son en cuantiosas ocasiones.*

*Gracias Pepe por todo lo mucho que he aprendido de ti. Contigo he aprendido el valor del razonamiento crítico, la capacidad del valorar el trabajo y el noble arte de la docencia, que hacen tan contagiosa la pasión por la ciencia.*

*Gracias a todo el resto de profesores y compañeros del departamento por sus incontables gestos de apoyo, palabras amables y ayuda en numerosas ocasiones. De forma muy encarecida me gustaría agradecer a Lola todo el trabajo de corrección su gerencias para la maquetación final de este trabajo, y ante todo por tu sencillez y los ánimos recibidos.*

*Gracias a Jorge y David por tantas horas dedicadas a mi aprendizaje. Con vosotros he aprendido mucho más que un sinfín de metodología, herramientas de trabajo y conceptos que impregnan este trabajo. Me habéis enseñado a pensar críticamente, a formular y contrastar hipótesis y tal vez lo más importante, la diferencia entre dedicarse a la ciencia y vivir la ciencia. Sois un auténtico referente en la ciencia y también fuera de ella, y estoy seguro que el tiempo me dará la razón. Agradeceros también vuestra disposición siempre presente a*

## Agradecimientos

*echar una mano en aquello que necesites y vuestra actitud afable y distendida tanto dentro como fuera de estos muros.*

*Gracias a Andrea, aquella que con merecida razón se autodenomina "mi hermana mayor científica". He aprendido mucho trabajando a tu lado, no sólo a nivel metodológico, sino también un puñado de actitudes y valores muy necesarios en este ámbito. Tenerme al lado no siempre es fácil, máxime cuando no tenemos el mismo concepto de temperatura de confort en invierno. En lo personal, gracias también por todo el apoyo mostrado en algún que otro momento de flaqueza, una actitud que te hace merecedora de tal calificativo.*

*Gracias Jose por enseñarme el valor del sacrificio y del trabajo bien hecho, por las muchas disertaciones científicas y no científicas, por tu predisposición siempre patente a ayudarme en aquello que hiciese falta. Gracias también por tan gratos ratos de ocio de viernes por la tarde/noche y/o fin de semana.*

*Gracias Patri por tantos buenos momentos de risas y diversión por doquier y por siempre contar conmigo para cualquier plan.*

*Gracias Mayka por tu gran labor de coordinación, tus sabios consejos, ánimos y los buenos ratos de ocio.*

*Gracias Ricardo por tu excelente ayuda, tu actitud crítica siempre constructiva y tu buen hacer, un pilar maestro de este grupo.*

*A Bea, por enseñarme la virtud de planificación, su afán por el trabajo bien hecho y su incesante optimismo. Gracias por todo el apoyo y motivación a lo largo de estos años.*

*A Salvatore, porque aunque ha sido poco el tiempo que hemos podido compartir he aprendido mucho de tu pasión y entusiasmo por la ciencia y en general, por la vida.*

*A Ángel, por su ejemplo de entereza y buen humor, siempre dispuesto a lo que haga falta y a crear buen ambiente.*

## Agradecimientos

*Gracias Nuria por tu aportación de optimismo y sencillez. Tu cercanía siempre resulta reconfortante ya que no siempre es fácil encarar la adversidad con una sonrisa.*

*A ti Felipe, gracias por enseñarme que la constancia y la entereza lo hacen todo posible, y que la madurez y el rigor científico pueden compaginarse con actitud amena y distendida.*

*Gracias Nacho por unos cuantos consejos informáticos, por hacer del rato de las comidas un paréntesis tan agradable y por algún que otro pedido on-line.*

*Gracias a vosotros/as Aida, Laura, María José, Juan Carlos, Marina por haber hecho de todos esos congresos momentos tan vívidos y memorables por remoto que fuera el lugar. Me llevo de aquellos ratos los mejores de los recuerdos, y como se suele decir, "los buenos recuerdos los crean sus gentes".*

*Gracias a Agustín, María y Lucía por vuestra alegría contagiosa y por dotar a este equipo de un aire rejuvenecedor y entusiasta.*

*Gracias Marisa por tantas horas de dedicación en el CNME, por tu trabajo y dedicación, máxime cuando ha sido a contrareloj y por tu valiosa franqueza.*

*Gracias a todos aquellos profesores de la carrera que se afanaron por transmitirnos el gusto por la bioquímica y la biología molecular y a tantos aquellos que me animaron desde el principio a iniciar este camino.*

*A mis amigos de la carrera, especialmente a Daniel y Juan Carlos, por los muchos ratos compartidos en cualquier rincón de Madrid y también muy lejos de él. Gracias por todas esas anécdotas y momentos que han hecho de Madrid mi otra casa, y por demostrarme que los amigos siempre están ahí, por mucho que sea el tiempo que pasó desde la última vez que nos vimos.*

*No puedo dejarme en el tintero unas líneas cargadas de emotividad para agradecer a mis amigos de Aranda la ilusión, confianza y diversión que durante tantos años me habeis*

## Agradecimientos

*ofrecido. Sois, como bien decís," la familia que se elige" y la razón por la cual siempre es grato regresar a la tierra de la infancia.*

*A Patricia, porque no imagino esta última etapa del camino sin ti ni sin tu apoyo incondicional. Gracias por haberme alentado a lo largo de todo este tiempo y haber compartido conmigo ilusiones y momentos inolvidables. Con ingeniosa maestría te has convertido en la arquitecta de mi felicidad, en el lucero del alba.*

*Finalmente las últimas líneas las quiero dedicar a mi familia que a lo largo de toda la vida han hecho lo imposible por permitirme llegar a donde estoy. Especialmente a mis padres y mi hermano por todo el apoyo y cariño que me han brindado a lo largo de todos estos años. Lo que soy os lo debo a vosotros y al hecho de que en todo momento hayais creído en mi.*

## Índice de contenidos:

RESUMEN.....	1
SUMMARY .....	5
I-ABREVIATURAS .....	9
II-INTRODUCCIÓN.....	15
2.1. El Encéfalo .....	15
2.1.1. El Cerebelo .....	15
2.1.2. La corteza cerebral .....	18
2.2. La sinapsis glutamatérgica .....	23
2.2.1. La zona activa.....	25
2.2.2. Organización de vesículas en pools.....	28
2.2.3. Ciclo vesicular sináptico.....	35
2.3. El citoesqueleto de actina.....	55
2.3.1. Dinámica del citoesqueleto de actina .....	55
2.3.2. Función de la actina presináptica.....	58
2.4. Modelo de Sinapsis Defectuosa: Síndrome del cromosoma X Frágil.....	63
2.4.1. Ultraestructura y señalización celular en células corticales Fmr1 KO.....	64
2.4.2. Dinámica del citoesqueleto de actina en células corticales Fmr1 KO.....	67
2.4.3. Relación entre la morfología sináptica y la dinámica del citoesqueleto de actina presináptico.....	68
III-OBJETIVOS .....	73

IV-MATERIALES & MÉTODOS .....	77
4.1. Materiales.....	77
4.1.1. Material Biológico.....	77
4.1.2. Material de cultivo .....	77
4.1.3. Equipos.....	78
4.1.4. Reactivos y fármacos.....	80
4.1.5. Portaobjetos y cubreobjetos.....	83
4.2. Métodos .....	84
4.2.1. Cultivo de neuronas granulares y corticales: modelos de estudio de la sinapsis glutamatérgica .....	84
4.2.2. Western Blot .....	87
4.2.3. Estudios del ciclo vesicular .....	89
4.2.4. Microscopía electrónica de transmisión .....	98
4.2.5. Determinación de los niveles de G/ F-Actina.....	104
4.3. Procesamiento de los datos .....	105
4.3.1. Análisis de inmunodetección en membrana .....	105
4.3.2. Análisis de FM1-43 .....	105
4.3.3. Análisis de vGluT1-pHluorina.....	110
4.3.4. Análisis de imágenes de microscopía electrónica de transmisión .....	113
4.3.5. Inmunocitoquímica.....	114
4.3.6. Estadística, ajustes, programas informáticos y maquetación de imágenes .....	114
V-RESULTADOS.....	119

5.1. La movilización de las vesículas con capacidad de reciclamiento en las neuronas granulares de cerebelo de rata requiere un estímulo intenso.....	119
5.1.1. La estimulación química libera una mayor proporción de vesículas marcadas con FM1-43 y aumenta la proporción de botones con un reciclamiento más eficiente .....	119
5.2. Los mecanismos endocitóticos sensibles a Brefeldina A (BFA) contribuyen al reciclamiento vesicular en neuronas granulares de cerebelo de rata .....	121
5.2.1. El tratamiento con BFA previo a la carga de FM1-43 reduce la densidad de botones funcionales y entorpece el reciclamiento vesicular .....	121
5.2.2. El tratamiento con BFA previo a una estimulación intensa y duradera incrementa la presencia de estructuras endosomales.....	124
5.2.3. El tratamiento con BFA después de la carga aumenta la densidad de botones funcionales y la velocidad de liberación.....	127
5.2.4. El tratamiento con BFA después de la estimulación aproxima las vesículas a la zona activa.....	130
5.2.5. BFA no afecta a la velocidad de exocitosis ni de fusión espontánea durante la estimulación .....	132
5.3. Los endosomas de reciclamiento generan VSs que pueden participar en el ciclo vesicular en una segunda estimulación .....	134
5.4 La disrupción del citoesqueleto de actina altera el reciclamiento vesicular sináptico y disminuye la densidad de sinapsis funcionales en neuronas granulares de cerebelo .....	137
5.4.1. La desestabilización del citoesqueleto de actina previa a la carga de FM1-43 disminuye la intensidad de marcaje y la densidad de botones funcionales ...	137

5.4.2. La desestabilización de la dinámica del citoesqueleto de actina previo a la carga de FM1-43 disminuye su intensidad de marcaje y la densidad de botones funcionales .....	140
5.4.3. El análisis ultraestructural evidencia la implicación del citoesqueleto de actina en el reciclamiento vesicular sináptico.....	143
5.4.4. La dinámica del citoesqueleto de actina modula la eficacia de reciclamiento de una subpoblación de botones .....	147
5.4.5. Análisis ultraestructural de los terminales sinápticos tratados con jasplakinolida o latrunculina-A tras una estimulación intensa y prolongada.....	150
5.4.6. El reportero vGluT1-pGHfluorina revela defectos excitotóxicos en células tratadas con JSK y LA .....	152
5.5. Las neuronas corticales carentes del gen FMR1 (Fmr1 KO) muestran un reciclamiento vesicular más eficiente .....	155
5.5.1. La despolimerización del citoesqueleto de actina disminuye la intensidad de marcaje en neuronas corticales carentes de FMR1 y aumenta la velocidad de liberación .....	155
5.5.2. La disrupción farmacológica de la dinámica del citoesqueleto de actina no produce alteraciones en la ultraestructura de neuronas corticales WT o Fmr1 KO en situación de reposo.....	159
5.5.3. El análisis ultraestructural de neuronas corticales revela una mayor densidad de vesículas sinápticas en los terminales Fmr1 KO y una mayor proporción de vesículas en íntima aposición con la zona activa .....	162
5.5.4. Estímulos de corta duración promueven la liberación de una mayor proporción de vesículas recicladas en las neuronas corticales de cerebro de ratón Fmr1KO que en las del ratón WT .....	165

5.5.5. Análisis mediante microscopía electrónica de la ultraestructura de rodajas de corteza cerebral en ratones WT y Fmr1 KO en situación de reposo.....	170
5.5.6. Análisis mediante microscopía electrónica de la ultraestructura de rodajas de corteza cerebral en ratones WT y Fmr1 KO sometidas a estimulación eléctrica .....	173
<b>VI-DISCUSIÓN</b> .....	179
6.1. La estimulación química libera una mayor proporción de vesículas marcadas con FM1-43 que la estimulación de campo y promueve un reciclamiento más eficiente.....	179
6.2. El marcaje específico de orgánulos reciclados permite visualizar diferentes modos de reciclamiento vesicular.....	180
6.3. Formas de reciclamiento vesicular en neuronas granulares de cerebelo y dependencia de los complejos adaptadores AP-1/AP-3 y de la dinámica del citoesqueleto de actina.....	183
6.3.1. La inhibición del reciclamiento vesicular mediado por AP-1/AP-3 y la disrupción del citoesqueleto de actina provocan una disminución del número de botones funcionales.....	185
6.3.2. En los botones de descarga débil la interferencia con la dinámica del citoesqueleto de actina afecta a la endocitosis y el reciclamiento vesicular es sensible a la inhibición de los complejos AP-1/AP-3.....	187
6.3.3. En los botones de reciclamiento vesicular eficiente la dinámica del citoesqueleto de actina es necesaria para la exocitosis y el reciclamiento vesicular es poco dependiente de AP-1/AP-3.....	193
6.4. Coexistencia de sinapsis en diferentes estadios de maduración en neuronas granulares de cerebelo <i>in vivo</i> y posibles implicaciones fisiológicas.....	195

6.5. Las neuronas corticales Fmr1 KO presentan un reciclamiento vesicular más eficiente que sus homólogas de fenotipo salvaje.....	199
6.5.1. La despolimerización de los filamentos de actina disminuye la intensidad de marcaje con FM1-43 en neuronas corticales Fmr1 KO y aumenta la velocidad de liberación de la sonda.....	199
6.5.2. La desestabilización del citoesqueleto de actina en situación de reposo no afecta a la ultraestructura presináptica de neuronas corticales.....	201
6.5.3. Las neuronas Fmr1 KO presentan mayor densidad de VSs y mayor número de VSs ancladas a la zona activa .....	202
6.5.4. Estímulos breves promueven la liberación de una mayor proporción de vesículas recicladas en neuronas Fmr1 KO.....	204
6.5.5. Análisis de ultraestructura de neuronas piramidales de corteza somatosensorial en situación de reposo .....	208
6.5.6. La estimulación eléctrica evidencia un reciclamiento vesicular más eficiente de las neuronas Fmr1 KO en micrografías de corteza cerebral .....	209
6.6. Causas de la mayor eficiencia en el reciclamiento vesicular de neuronas Fmr1 KO e implicaciones fisiológicas .....	210
VII-CONCLUSIONES.....	217
7.1. Neuronas granulares de cerebelo de rata.....	217
7.2. Neuronas corticales de cerebro de ratón.....	217
VIII-BIBLIOGRAFÍA .....	221
IX-ANEXOS .....	241

## Índice de figuras:

### II-INTRODUCCIÓN

Figura 1: Circuito neuroquímico de la corteza cerebral .....	17
Figura 2: Tinción de Golgi de la corteza cerebral .....	22
Figura 3: Sinapsis glutamatérgica .....	25
Figura 4: Citomatriz en la zona activa .....	28
Figura 5: Organización de los pools vesiculares .....	29
Figura 6: Vesículas del pool de reciclamiento y de reserva en un terminal .....	32
Figura 7: Sinapsina es fundamental para el mantenimiento del pool de reserva .....	35
Figura 8: Proteínas integrantes del complejo SNARE .....	37
Figura 9: citoarquitectura de la zona activa .....	38
Figura 10: Ciclo de las proteínas SNARE/SM .....	39
Figura 11: Mecanismo de acción de sinaptotagmina y complexina en la fusión vesicular dependiente de calcio .....	41
Figura 12: Tipos de endocitosis .....	43
Figura 13: Factores proteicos implicados en la EMC .....	46
Figura 14: Participación de dinamina-1 y dinamina-3 en la endocitosis en masa .....	49
Figura 15: Esquema del reciclamiento vesicular sináptico en neuronas granulares de cerebelo de rata.....	51
Figura 16: Esquema gráfico del reciclamiento vesicular mediante endocitosis ultrarrápida .....	52
Figura 17: Modelo integrador para el reciclamiento vesicular sináptico en función de la concentración de calcio .....	54
Figura 18: La estimulación neuronal promueve un incremento de la polimerización de actina presináptica .....	57
Figura 19: Modelo gráfico de la distribución topológica del cluster de VSs y la citomatriz de un terminal presináptico.....	60

Figura 20: Participación del citoesqueleto de actina en el ciclo vesicular .....	63
Figura 21: Alteraciones morfológicas en las espinas dendríticas y terminales presinápticos de neuronas corticales de ratón .....	65
Figura 22: Modelo de estabilización de las espinas dendríticas dependiente de FMRP .....	67
Figura 23: Modelo de regulación de la agregación y liberación de VSs mediado por F-actina y neurexina.....	69

#### IV-MATERIALES & MÉTODOS

Figura 24: Estructura química de FM1-43 y espectros de absorción y emisión .....	90
Figura 25: Esquema del protocolo estándar de monitorización con FM1-43 .....	92
Figura 26: Esquema del protocolo de FM1-43 empleado en preparaciones tratadas con Brefeldina-A.....	92
Figura 27: Esquema del protocolo de FM1-43 empleado en preparaciones tratadas con Jasplakinolida y Latrunculina-A.....	93
Figura 28: Esquema gráfico de vGluT1-pHluorina .....	95
Figura 29: Esquema del protocolo de vGluT1-pHluorina empleado en preparaciones tratadas con BFA .....	97
Figura 30: Microscopía electrónica correlativa de neuronas hipocampales de rata marcadas mediante fotoconversión de FM1-43 .....	101
Figura 31: Consola de IgorPro empleada en el procesamiento de los experimentos de imagen con FM1-43.....	107
Figura 32: Configuración de opciones para importar el archivo multidimensional *.tiff con las imágenes del experimento con el fondo sustraído, máscara y obtención del archivo RoiSet .....	108
Figura 33: Campo de neuronas granulares de cerebelo de rata marcadas con FM1-43, máscara binaria con los ROIs e imagen de contraste de fase.....	109

Figura 34: Consola de la Macro "SARFIA" en IgorPro con la configuración de parámetros para la creación de la máscara con los ROIs .....	111
Figura 35: Cuadro de diálogo con las opciones a consignar para importar la máscara obtenida con SARFIA .....	112
Figura 36: Perfil cinético de fluorescencia de neuronas granulares transfectadas con vGluT1-pHluorina.....	113

## V-RESULTADOS

Figura 37: La estimulación química libera una mayor proporción de vesículas marcadas con FM1-43 y aumenta la proporción de botones con un reciclamiento más eficiente .....	120
Figura 38: El tratamiento con BFA previo a la carga de FM1-43 reduce la densidad de botones funcionales y entorpece el reciclamiento vesicular .....	123
Figura 39: El tratamiento con BFA previo a una estimulación intensa y duradera incrementa la presencia de estructuras endosomales.....	125
Figura 40: El tratamiento con BFA después de la carga aumenta la densidad de botones funcionales y la velocidad de liberación.....	129
Figura 41: El tratamiento con BFA después de la estimulación aproxima las vesículas a la zona activa.....	131
Figura 42: BFA no afecta a la velocidad de exocitosis ni de fusión espontánea durante la estimulación.....	133
Figura 43: Los endosomas de reciclamiento generan VSs que pueden participar en el ciclo vesicular en una segunda estimulación .....	136
Figura 44: La desestabilización del citoesqueleto de actina previa a la carga de FM1-43 disminuye la intensidad de marcaje y la densidad de botones funcionales .....	139

Figura 45: La desestabilización de la dinámica del citoesqueleto de actina previo a la carga de FM1-43 disminuye la intensidad de marcaje y la densidad de botones funcionales .....	142
Figura 46: Los tratamientos con JSK y LA en situación de reposo no modifican la morfología de los terminales sinápticos .....	144
Figura 47: El análisis ultraestructural evidencia la implicación del citoesqueleto de actina en el reciclamiento vesicular sináptico.....	146
Figura 48: La dinámica del citoesqueleto de actina modula la eficacia de reciclamiento de una subpoblación de botones .....	149
Figura 49: Análisis ultraestructural de los terminales sinápticos tratados con jasplakinolida o latrunculina-A tras una estimulación intensa y prolongada.....	151
Figura 50: El reportero vGluT1-pGHfluorina revela defectos excitotóxicos en células tratadas con JSK y LA .....	154
Figura 51: La despolimerización del citoesqueleto de actina disminuye la intensidad de marcaje en neuronas corticales carentes de FMR1 y aumenta la velocidad de liberación .....	158
Figura 52: La disrupción farmacológica de la dinámica del citoesqueleto de actina no produce alteraciones en la ultraestructura de neuronas corticales WT o Fmr1 KO en situación de reposo.....	161
Figura 53: El análisis ultraestructural de neuronas corticales revela una mayor densidad de vesículas sinápticas en los terminales Fmr1 KO y una mayor proporción de vesículas en íntima aposición con la zona activa .....	164
Figura 54: Estímulos de corta duración promueven la liberación de una mayor proporción de vesículas recicladas en las neuronas corticales de cerebro de ratón Fmr1KO que en las del ratón WT.....	166
Figura 55: El tamaño del RRP es mayor en neuronas Fmr1 KO .....	169

Figura 56: Análisis mediante microscopía electrónica de la ultraestructura de rodajas de corteza cerebral en ratones WT y Fmr1 KO en situación de reposo ..... 172

Figura 57: Análisis mediante microscopía electrónica de la ultraestructura de rodajas de corteza cerebral en ratones WT y Fmr1 KO sometidas a estimulación eléctrica .. 174

## VI-DISCUSIÓN

Figura 58: Secuencia de eventos durante la EM desde la formación de los endosomas a partir de la membrana hasta la regeneración de VSs a partir de los mismos ..... 181

Figura 59: Mecanismo de actuación de BFA sobre el reciclamiento vesicular sináptico cuando se administra previo a una estimulación intensa ..... 188

Figura 60: Mecanismo de actuación de BFA en la modulación de la respuesta excitotóxica cuando es administrada después de una estimulación intensa ..... 190

Figura 61: Resumen gráfico para la modelización de los botones de descarga fuerte y descarga débil ..... 196

Figura 62: Participación del citoesqueleto de actina en los distintos mecanismos de endocitosis..... 199

## Índice de tablas:

### IV-MATERIALES & MÉTODOS

Tabla 1: Relación de fármacos .....	81
Tabla 2: Relación de anticuerpos primarios .....	82
Tabla 3: Relación de sueros .....	83
Tabla 4: Relación de anticuerpos secundarios.....	83

### V-RESULTADOS

Tabla 5: Efecto del tratamiento con BFA previo a la carga de FM1-43 sobre las constantes temporales de decaimiento exponencial y la fluorescencia neta .....	122
Tabla 6: Efecto del tratamiento con BFA tras la carga de FM1-43 sobre las constantes temporales de decaimiento exponencial y la fluorescencia neta .....	128
Tabla 7: Efecto del tratamiento con JSK y LA previo a la carga de FM1-43 sobre las constantes temporales de decaimiento exponencial .....	141
Tabla 8: Efecto del tratamiento con JSK y LA tras la carga de FM1-43 sobre las constantes temporales de decaimiento exponencial .....	148

## RESUMEN

El flujo de información en el cerebro se basa en el establecimiento de contactos neuronales o sinapsis, que traducen las señales eléctricas en señales químicas y viceversa. Este proceso ocurre al liberarse mensajeros químicos o neurotransmisores almacenados en vesículas sinápticas (VSs) desde una neurona presináptica y ser reconocidos por receptores específicos localizados en las espinas dendríticas de la neurona postsináptica (Sudhof 2012b). Para que este proceso tenga lugar, es necesario que las VSs sean transferidas desde el interior del terminal sináptico hacia la zona activa y, una vez allí, éstas sean ancladas ("docked") y sometidas a un proceso de maduración funcional ("priming"), que las hace competentes para la exocitosis cuando llega un potencial de acción (Jahn & Fasshauer 2012, Sudhof 2012a). Una vez se han fusionado las VSs con la membrana plasmática y han liberado el neurotransmisor a la hendidura sináptica, las VSs son recicladas mediante diferentes mecanismos de endocitosis que permiten que, tras ser rellenas con neurotransmisor, estén funcionalmente disponibles para volver a ser liberadas con una nueva estimulación. Todo este proceso, en su conjunto, es lo que se conoce como ciclo vesicular.

La dinámica del citoesqueleto de actina participa activamente en, prácticamente, todas las etapas del ciclo vesicular, facilitando la translocación de las VSs a la zona activa y regulando tanto la exocitosis como los diferentes mecanismos de endocitosis descritos (Rust & Maritzen 2015). La contribución relativa de los diferentes mecanismos de reciclamiento varía entre sinapsis dependiendo de las diferentes condiciones de estimulación y de los distintos estadios de maduración de las sinapsis (Bartolome-Martin *et al.* 2012), habiéndose constatado que la endocitosis masiva (EM), dependiente de los complejos adaptadores AP-1/AP-3 es mayoritaria en los estadios más inmaduros (Korber *et al.* 2012, Shetty *et al.* 2013).

En este trabajo, hemos combinando técnicas de imagen en célula viva (FM1-43 y vGluT1-pHluorina), análisis de ultraestructura mediante microscopía electrónica y técnicas de inmunocitofluorescencia para estudiar diferentes procesos del ciclo vesicular relacionados con la eficacia de reciclamiento en dos modelos celulares: neuronas granulares de cerebelo de rata y neuronas corticales de cerebro de ratón, tanto de genotipo silvestre (WT) como en un modelo de sinapsis defectuosa (Fmr1 KO).

En neuronas granulares de cerebelo de rata, se esclareció que los botones de menor eficacia de reciclamiento, o "botones de descarga débil", caracterizados por una mayor contribución de la EM durante el reciclamiento vesicular, dependen en mayor medida de la participación de AP-1/AP-3 para la regeneración de VSs funcionales a partir de los endosomas previamente formados, llegando incluso a ser totalmente dependiente de dichos complejos en una subpoblación de botones sinápticos. A su vez, la dinámica del citoesqueleto de actina es determinante en la promoción de la fase excitotónica del ciclo vesicular, permitiendo el reclutamiento de VSs en las inmediaciones de la zona activa y facilitando la exocitosis. En este sentido, los botones de descarga fuerte o de mayor eficacia de reciclamiento son los que muestran una mayor sensibilidad a la alteración farmacológica de la polimerización de los filamentos de actina. Los resultados encontrados muestran que el proceso más afectado en dichos botones es la exocitosis, si bien la tensión mecánica ejercida por el citoesqueleto de actina es necesaria para todas las formas de endocitosis (Wu *et al.* 2016) y, por tanto, afecta a ambas poblaciones de botones.

En neuronas corticales de cerebro de ratón se observó que la alteración farmacológica del citoesqueleto de actina no se traduce en alteraciones de la ultraestructura presináptica de neuronas WT ni Fmr1 KO en condiciones de reposo. Sin embargo, en las células Fmr1 KO, la despolimerización del citoesqueleto de actina previa a una estimulación intensa disminuye el número de VSs recicladas y aumenta la velocidad de exocitosis en consonancia con la disfunción en la polimerización de los filamentos de actina descrita en el síndrome del X-Frágil (SXF) (Huber *et al.* 2015).

En relación al reciclamiento vesicular, se ha demostrado que los estímulos breves promueven la liberación de una mayor proporción de VSs recicladas en neuronas Fmr1 KO sin que se modifique el tamaño del pool de reciclamiento (RP). Estos resultados, que a priori sugieren un aumento del tamaño del RRP (por sus siglas en inglés, *Readily Releasable Pool*, o conjunto de VSs de inmediata liberación) en las neuronas Fmr1 KO, fueron confirmados mediante estudios de microscopía electrónica en cultivo de neuronas piramidales disociadas y en secciones de corteza somatosensorial de cerebro, observándose además en ambos modelos un mayor número de VSs por unidad de superficie en las neuronas de genotipo Fmr1 KO. En secciones de corteza somatosensorial de ratón Fmr1 KO se constató un aumento de la densidad de contactos sinápticos asimétricos asociados a una reducción de la superficie postsináptica, siendo este aspecto un rasgo fisiológico característico del SXF (Bagni & Greenough 2005, Dolan *et al.* 2013). En estas preparaciones se

confirmó el aumento significativo del número de VSs "docked", siendo éstas el correlato ultraestructural del RRP (Schikorski & Stevens 2001, Watanabe *et al.* 2013b). Además, cuando dichas secciones corticales se sometieron a una estimulación eléctrica intensa se encontró una mayor acumulación de estructuras endosomales en terminales WT, un hecho indicativo de que en el genotipo WT la contribución de la EM es mayor que en el genotipo Fmr1 KO.

En su conjunto, los resultados encontrados en neuronas corticales sugieren que el reciclamiento vesicular es más eficiente en neuronas Fmr1 KO en relación a sus homólogas WT.

## Bibliografía

- Bagni, C. and Greenough, W. T. (2005) From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 376-387.
- Bartolome-Martin, D., Ramirez-Franco, J., Castro, E., Sanchez-Prieto, J. and Torres, M. (2012) Efficient synaptic vesicle recycling after intense exocytosis concomitant with the accumulation of non-releasable endosomes at early developmental stages. *J Cell Sci*, **125**, 422-434.
- Dolan, B. M., Duron, S. G., Campbell, D. A. *et al.* (2013) Rescue of fragile X syndrome phenotypes in Fmr1 KO mice by the small-molecule PAK inhibitor FRAX486. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 5671-5676.
- Huber, K. M., Klann, E., Costa-Mattioli, M. and Zukin, R. S. (2015) Dysregulation of Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Mouse Models of Autism. *J Neurosci*, **35**, 13836-13842.
- Jahn, R. and Fasshauer, D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, **490**, 201-207.
- Korber, C., Horstmann, H., Satzler, K. and Kuner, T. (2012) Endocytic structures and synaptic vesicle recycling at a central synapse in awake rats. *Traffic*, **13**, 1601-1611.
- Rust, M. B. and Maritzen, T. (2015) Relevance of presynaptic actin dynamics for synapse function and mouse behavior. *Exp Cell Res*, **335**, 165-171.
- Schikorski, T. and Stevens, C. F. (2001) Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat Neurosci*, **4**, 391-395.
- Shetty, A., Sytnyk, V., Leshchynska, I., Puchkov, D., Haucke, V. and Schachner, M. (2013) The neural cell adhesion molecule promotes maturation of the presynaptic endocytotic machinery by switching synaptic vesicle recycling from adaptor protein 3 (AP-3)- to AP-2-dependent mechanisms. *J Neurosci*, **33**, 16828-16845.
- Sudhof, T. C. (2012a) Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a011353.
- Sudhof, T. C. (2012b) The presynaptic active zone. *Neuron*, **75**, 11-25.
- Watanabe, S., Rost, B. R., Camacho-Perez, M., Davis, M. W., Sohl-Kielczynski, B., Rosenmund, C. and Jorgensen, E. M. (2013) Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*, **504**, 242-247.
- Wu, X. S., Lee, S. H., Sheng, J. *et al.* (2016) Actin Is Crucial for All Kinetically Distinguishable Forms of Endocytosis at Synapses. *Neuron*, **92**, 1020-1035.



## SUMMARY

In the brain the flow of information is based on the establishment of neural contacts or synapses, which converts electrical signals into chemical signals and vice versa. This process occurs when chemical messengers or neurotransmitters stored in synaptic vesicles are released from a presynaptic neuron and are recognized by specific receptors on the dendritic spines of the postsynaptic neuron (Sudhof 2012b). For this process to take place, it is necessary the trafficking of the synaptic vesicles (SVs) from inside the synaptic terminal to the active zone, and once there they are anchored ("docked") and subjected to a functional maturation process ("priming") that makes them competent for exocytosis before the arrival of an action potential (Jahn & Fasshauer 2012, Sudhof 2012a). Once SVs have been fused with the plasma membrane and have released the neurotransmitter to the synaptic cleft, SVs are recycled by different mechanisms of endocytosis that allow them to be functionally available, after being refilled with neurotransmitter, to be released upon a new stimulation. All together, this process is known as vesicular cycle.

The dynamics of actin cytoskeleton participates actively in almost every step of the vesicular cycle, facilitating the translocation of the VSs to the active zone and regulating both the exocytosis and the different mechanisms of endocytosis described (Rust & Maritzen 2015). The relative contribution of the different recycling mechanisms varies between synapses depending on different stimulation conditions and different maturation stages of the synapses (Bartolome-Martin *et al.* 2012), having verified that activity-dependent bulk endocytosis (ADBE), which is dependent on adapter complexes AP-1/AP-3, is the major form in the most immature synapses (Korber *et al.* 2012, Shetty *et al.* 2013).

Combining imaging techniques in living cells (FM1-43 and vGluT1-pHluorine), ultrastructural analysis by electron microscopy and immunocytofluorescence techniques, in this work we have studied different processes of the vesicular cycle related to recycling efficiency in two cellular models: rat cerebellar granule neurons and mouse brain cortical neurons, from both wild-type genotype (WT) and a defective synapse model (Fmr1 KO).

In rat cerebellar granule neurons, it was clarified that the less efficient recycling boutons population, or "weak unloading boutons", characterized by a greater contribution of ADBE during vesicular recycling, depend to a greater extent on the

participation of AP-1/AP-3 for functional SV regeneration from the previously formed endosomes, even becoming totally dependent on such complexes in a subpopulation of synaptic boutons. In addition, the dynamics of the actin cytoskeleton is determinant in the promotion of the exocytotic step of the vesicular cycle, allowing the recruitment of SVs in the vicinity of the active zone and facilitating exocytosis. In this way, the strong unloading boutons that show great recycling efficiency are those show the greater sensitivity to the pharmacological alteration of the polymerization of the actin filaments. The results show that the most affected process in these boutons is exocytosis, although the mechanical tension exerted by the actin cytoskeleton is necessary for all forms of endocytosis (Wu *et al.* 2016) and, therefore, affects both populations of boutons.

In mouse brain cortical neurons it was observed that the pharmacological alteration of the actin cytoskeleton does not lead to presynaptic ultrastructural alterations in either WT or Fmr1 KO neurons in resting conditions. However, in Fmr1 KO neurons, the depolymerization of actin cytoskeleton before an intense stimulation decreases the number of recycled SVs and increases the exocytotic rate in accordance with the impairment in actin filament polymerization reported in Fragile-X Syndrome (Huber *et al.* 2015).

In relation with vesicular recycling, it has been demonstrated that brief stimuli promote the release of a greater proportion of recycled SVs in Fmr1 KO neurons without modifying the recycling pool (RP) size. These results, which a priori suggest an increase in the size of RRP (Readily Releasable Pool in Fmr1 KO neurons, were then confirmed by electron microscopy studies in dissociated pyramidal neurons culture and in brain somatosensory cortex sections, also observing in both models a greater number of SVs per area unit in Fmr1 KO neurons. In somatosensory cortex sections from Fmr1 KO mice, it was observed an increase in the density of asymmetric synaptic contacts associated to a reduction of postsynaptic surface, being this fact a characteristic feature in FXS (Bagni & Greenough 2005, Dolan *et al.* 2013). In these samples it was confirmed the significant increase in the number of docked SVs, being these SVs the ultrastructural correlate of the RRP (Schikorski & Stevens 2001, Watanabe *et al.* 2013b). Moreover, when these cortical sections were submitted to an intense electrical stimulation, it was found a greater accumulation of endosomal structures in WT terminals, an indicative fact about the greater contribution of ADBE in WT genotype in comparison with the Fmr1 KO genotype.

All together, the results found in cortical neurons suggest that vesicular recycling is more efficient in Fmr1 KO neurons than in the WT ones.

## Bibliography

- Bagni, C. and Greenough, W. T. (2005) From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 376-387.
- Bartolome-Martin, D., Ramirez-Franco, J., Castro, E., Sanchez-Prieto, J. and Torres, M. (2012) Efficient synaptic vesicle recycling after intense exocytosis concomitant with the accumulation of non-releasable endosomes at early developmental stages. *J Cell Sci*, **125**, 422-434.
- Dolan, B. M., Duron, S. G., Campbell, D. A. et al. (2013) Rescue of fragile X syndrome phenotypes in Fmr1 KO mice by the small-molecule PAK inhibitor FRAX486. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 5671-5676.
- Huber, K. M., Klann, E., Costa-Mattioli, M. and Zukin, R. S. (2015) Dysregulation of Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Mouse Models of Autism. *J Neurosci*, **35**, 13836-13842.
- Jahn, R. and Fasshauer, D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, **490**, 201-207.
- Korber, C., Horstmann, H., Satzler, K. and Kuner, T. (2012) Endocytic structures and synaptic vesicle recycling at a central synapse in awake rats. *Traffic*, **13**, 1601-1611.
- Rust, M. B. and Maritzen, T. (2015) Relevance of presynaptic actin dynamics for synapse function and mouse behavior. *Exp Cell Res*, **335**, 165-171.
- Schikorski, T. and Stevens, C. F. (2001) Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat Neurosci*, **4**, 391-395.
- Shetty, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., Puchkov, D., Haucke, V. and Schachner, M. (2013) The neural cell adhesion molecule promotes maturation of the presynaptic endocytotic machinery by switching synaptic vesicle recycling from adaptor protein 3 (AP-3)- to AP-2-dependent mechanisms. *J Neurosci*, **33**, 16828-16845.
- Sudhof, T. C. (2012a) Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a011353.
- Sudhof, T. C. (2012b) The presynaptic active zone. *Neuron*, **75**, 11-25.
- Watanabe, S., Rost, B. R., Camacho-Perez, M., Davis, M. W., Sohl-Kielczynski, B., Rosenmund, C. and Jorgensen, E. M. (2013) Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*, **504**, 242-247.
- Wu, X. S., Lee, S. H., Sheng, J. et al. (2016) Actin Is Crucial for All Kinetically Distinguishable Forms of Endocytosis at Synapses. *Neuron*, **92**, 1020-1035.



# Abreviaturas

## I-ABREVIATURAS

**ABPs:** del inglés, *Acting Binding Proteins*. En castellano, proteínas de unión a actina.

**aCSF:** del inglés, artificial CerebroSpinal Fluid. En castellano, fluido espinocerebral artificial.

**ARF1:** acrónimo del inglés, *ADP-Ribosylation Factor 1*. En castellano, factor de ADP-ribosilación 1.

**Arp2/3:** del inglés, *Actin-related proteins 2/3*. En castellano, proteínas relacionadas con la actina.

**ADBE:** del inglés, *Activity Dependent Bulk Endocytosis*. En castellano, "endocitosis masiva" (**EM**).

**ADF:** del inglés, *Actin Depolymerizing Factor*. En castellano, factor de despolimerización de actina.

**AMPA:** Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico.

**AMPAR:** Receptor ionotrópico activado por AMPA.

**AMPc:** Adenosin monofosfato cíclico.

**AP-1/ AP-2/ AP-3/ AP-180:** del inglés, *Adaptor Protein Complex 1/ 2/ 3/ 180*. En castellano, proteínas adaptadoras.

**Baf A1:** del inglés, Bafilomycin A1. En castellano, bafilomicina A1.

**BAR** (dominio): Bin-Amfifisina-RV. **BFA:** Brefeldina A.

**Bss:** Proteína presináptica Bassoon.

**CAM:** acrónimo del inglés, *Cell Adhesion Molecule*. En castellano, molécula de adhesión celular.

**CaMKII:** Calcio-calmodulina quinasa de tipo II.

**CAST:** acrónimo del inglés, *Cytomatrix at the Active zone STructural protein*. En castellano, proteína estructural de citomatrix en la zona activa.

**CDK5:** del inglés, *Cyclin-Dependent Kinase 5*. Quinasa dependiente de ciclina 5.

**CGC:** acrónimo de Células Granulares de Cerebelo.

**cGKs:** Proteínas quinasas dependientes de GMPC.

**CME:** del inglés, *Clathrin-Mediated Endocytosis*. En castellano, endocitosis mediada por clatrina (EMC).

**CYFIP:** del inglés, *Cytoplasmatic FMRP Interacting Protein*. En castellano, factor proteico citoplasmático de interacción con FMRP

**DAB:** 3,3'-Di-Amino-Bencidina.

## Abreviaturas

**DEPC:** acrónimo del inglés *Di-Ethyl PiroCarbonate*. En castellano, pirocarbonato de dietilo.

**DIV:** acrónimo de *Días In Vitro*.

**EBSS:** del inglés, *Earle's Balanced Salt Solution*. Solución de sales estabilizada de Earle.

**EGL:** acrónimo del inglés, *External Granule Layer*. En castellano, capa granular externa.

**FM1-43:** Fei Mao 1-43.

**FM1-43<sub>FX</sub>:** análogo fijable de FM1-43.

**FMR1 KO:** acrónimo del inglés, *Fragile Mental Retardation 1 Knock-Out*. En castellano, genotipo carente del gen que codifica para FMR1.

**FMRP:** del inglés, *Fragile-X Mental retardation Protein*. En castellano, proteína asociada al retraso mental del síndrome del X-frágil

**GABA:** acrónimo del inglés, *Gamma Amino Butiric-Acid*. En castellano, ácido gamma aminobutírico.

**GAPDH:** acrónimo del inglés *Gliceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*. En castellano, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

**GABAR:** Receptores de GABA.

**GEF:** acrónimo del inglés, *Guanine-nucleotide Exchange Factor*. En castellano, factor intercambiador de nucleótidos de guanina.

**GFP:** acrónimo del inglés, *Green Fluorescent Protein*. En castellano, proteína verde fluorescente.

**GluA1:** subunidad A1 del receptor AMPA.

**GSK3:** Glucógeno Sintasa quinasa 3.

**GTP:** acrónimo del inglés, *Guanosin TriPhosphate*. En castellano Guanosín Trifosfato.

**HBM:** acrónimo del inglés, *HEPES Buffer Medium*. En castellano, medio tamponado con HEPES.

**HRP:** acrónimo del inglés, *HorseRadish Peroxidase*. En castellano, peroxidasa de rábano.

**IGL:** acrónimo del inglés, *Inner Granule Layer*. En castellano, capa granular interna.

**IP3R:** Receptores de Inositol Trifosfato.

**JSK:** Jasplakinolida.

**KO:** acrónimo del inglés, *Knock-Out* (carente para un gen en cuestión).

**LA:** Latrunculina A.

**LTD:** acrónimo del inglés, *Long Term Depression*. En Castellano, depresión a largo plazo

## Abreviaturas

**LTP:** acrónimo del inglés, *Long Term Potentiation*. En Castellano, potenciación a largo plazo.

**MAPK:** acrónimo del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase. En castellano, proteína quinasa activada por mitógeno.

**MET:** acrónimo de Microscopía Electrónica de Transmisión.

**mGluR5:** acrónimo del inglés, metabotropic Glutamate Receptor 5. En castellano, receptor metabotrópico de glutamato 5.

**MUNC:** del inglés, *Mammalian homologue of UNCoordinated phenotype*. En castellano, proteína homóloga de mamífero de fenotipo descordinado.

**mTORC1/ mTORC2:** del inglés, *mammalian Target Of Rapamycin Complex 1/2*. En castellano, complejo de mamífero sensible a rapamicina 1/2.

**NMDA:** acrónimo de N-metil-D-Aspartato.

**PAK:** acrónimo del inglés, *p21-activated kinase*. En castellano, quinasa activada por p21.

**PB:** acrónimo del inglés *Phosphate Buffer*. En castellano, tampón fosfato.

**PBS:** acrónimo del inglés, *Phosphate Buffer Solution*. En castellano, solución tamponada de fosfato.

**PC:** del inglés, *Photoconverted*. En castellano, fotoconvertido (en alusión a orgánulos de reciclamiento).

**PDE:** acrónimo en inglés de *Phosphodiesterase*. En castellano, fosfodiesterasas.

**PI(4,5)P<sub>2</sub>:** Fosfatidil Inositol 4,5-difosfato.

**PKA:** acrónimo de Proteína quinasa A.

**PKC:** acrónimo de Proteína quinasa C.

**PSD:** acrónimo del inglés, *Post Synaptic Density*. En castellano, densidad post-sináptica.

**Rac1:** acrónimo de *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*. En castellano, sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras.

**Rho A:** del inglés, *Ras HOmology A*. En castellano, proteína de homología a Ras.

**RIM:** acrónimo del inglés, *Rab3 Interacting Molecule*. En castellano, molécula de interacción con Rab 3.

**RIM-BP:** acrónimo del inglés *RIM- Binding Protein*. En castellano, proteína de unión a RIM.

**ROI:** acrónimo del inglés, *Region Of Interest*. En castellano, región de interés.

**ROS:** acrónimo del inglés, *Reactive Oxygen Species*. En castellano, especies reactivas del oxígeno.

## Abreviaturas

**RP:** acrónimo del inglés, *Recycling Pool*. En castellano, conjunto de vesículas sinápticas que participan en el ciclo vesicular.

**RRP:** acrónimo del inglés, *Readily Releasable Pool*. En castellano, conjunto de vesículas sinápticas preparadas para su liberación.

**RtP:** acrónimo del inglés *Resting Pool*. En castellano, Pool de Reserva.

**SDS:** acrónimo del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate*. En castellano, dodecil sulfato sódico.

**SEM:** acrónimo del inglés, *Standard Error of the Mean*. En castellano, error estándar de la media.

**SNAP:** acrónimo del inglés, *Soluble NSF Attachment Protein*. En castellano, proteína unida a NSF soluble.

**SNARE:** acrónimo del inglés, *Soluble NSF Attachment Protein Receptor*. En castellano, receptores de SNAP.

**SNC:** acrónimo de Sistema Nervioso Central.

**STP:** acrónimo del inglés, *Short Term Plasticity*. En castellano, plasticidad a corto plazo.

**SV2:** acrónimo del inglés, *Synaptic Vesicle Protein 2*. En castellano, proteína de la vesícula sináptica 2.

**Syn:** Proteína vesicular Sinapsina.

**SXF:** acrónimo de Síndrome del X Frágil.

**Syt1:** Proteína vesicular Sinaptotagmina 1.

**U.A.:** acrónimo de *Unidades Arbitrarias*

**UBC:** acrónimo del inglés, *Unipolar Brush Cells*. En castellano, células unipolares en cepillo.

**VAMP:** acrónimo del inglés, *Vesicle Associated Membrane Protein*. En castellano, proteína vesicular asociada a la membrana.

**v-ATPasa:** del inglés, *vacuolar-ATPase*. Bomba (ATPasa) de protones vacuolar.

**VCC:** acrónimo de Vesícula Cubierta por Clatrina.

**vGluT1:** del inglés, *vesicular Glutamate Transporter 1*. En castellano, transportador vesicular de glutamato de tipo 1.

**vGluT1-pH:** del inglés *vesicular Glutamate Transporter 1 pHluorin*. En castellano, fluorina asociada al transportador vesicular de glutamato de tipo 1.

**VS:** acrónimo de Vesícula Sináptica.

**WT:** acrónimo del inglés, *Wild Type*. En castellano, fenotipo silvestre.

**ZA:** acrónimo de Zona Activa.

## II-Introducción

---

*"Lo último que uno sabe es por donde empezar"*

Balise Pascal



# Introducción

## II-INTRODUCCIÓN

### 2.1. El Encéfalo

El encéfalo es el principal órgano del sistema nervioso central (SNC), siendo el centro coordinador de las funciones conscientes y autónomas. Desde un punto de vista anatómico se divide en 3 regiones: el cerebro anterior o *prosencefalo*, integrado a su vez por el telencefalo o corteza cerebral y el diencefalo (tálamo, hipotálamo y epítálamo); el cerebro medio o *mesencefalo*, que conecta el cerebro anterior y posterior, alojando la sustancia nigra, el núcleo rojo y los tubérculos cuadrigemios; y finalmente el cerebro posterior o *rombencefalo*, compuesto por el mielencefalo (bulbo raquídeo y pares craneales VIII, IX, X, XI y XII) y el metencefalo (puente, cerebelo y pares craneales V, VI, VII y VIII; (Kandel 2000).

#### 2.1.1. El Cerebelo

El cerebelo es un órgano impar localizado en la región antero-dorsal del rombencefalo, sobre el techo del cuarto ventrículo (Hashimoto & Hibi 2012).

Su función principal es actuar como centro coordinador y refinador del movimiento, integrando la información motora procedente de la corteza cerebral y exportándola al aparato locomotor a través de sus vías eferentes (Kandel 2000, Hashimoto & Hibi 2012).

##### 2.1.1.1. Estructura y citología del cerebelo

El cerebelo se compone de una capa de materia gris en su parte externa, conocida como corteza cerebelosa, una más interna de materia blanca y 3 pares de núcleos denominados *dentado*, *fastigial* e *interpuesto*. Éste a su vez se conecta con los núcleos basales a través de 3 pares de pedúnculos cerebelosos simétricos: inferior, medio y superior, siendo este último el que contiene la mayoría de las proyecciones eferentes.

A nivel citológico, el cerebelo se compone de neuronas excitatorias, inhibitorias y células de glía. Entre las neuronas excitatorias glutamatérgicas se encuentran las neuronas granulares (modelo de estudio en el presente trabajo), las células unipolares

## Introducción

en cepillo o UBC (del inglés, *Unipolar Brush Cells*) y las células excitatorias de proyección de los núcleos cerebelares profundos. Entre las neuronas inhibitorias, GABAérgicas, se encuentran diferentes tipos celulares, entre los que cabe resaltar las neuronas de Purkinge, principales neuronas eferentes de la corteza cerebelar. Aparte de éstas, existen numerosas interneuronas en la corteza cerebelosa como son las células de Golgi, células de Lugaro, células en candelabro, células en cesta y neuronas estrelladas (Altman & Bayer 1977). En cuanto a las células de glía, son de destacar las células de la glía de Bergmann, astrocitos de cerebelo con una disposición similar a la de la glía radial de la corteza cerebral, con funciones de soporte y señalización en el proceso de migración de las células granulares (Xu *et al.* 2013). Adicionalmente se encuentran astrocitos, oligodendrocitos y células de microglía.

Todas estas células se disponen en una estructura trilaminar, formando desde la zona superficial a la más profunda, las siguientes capas: capa molecular o plexiforme, capa de las neuronas de Purkinge y capa de las células granulares (fig 1). La capa molecular está formada por los axones de las fibras granulares, denominados "fibras paralelas" y el árbol dendrítico de las neuronas de Purkinge (Ramón y Cajal 1893). Por debajo de ésta, se localiza la capa de las células de Purkinge, así llamada por alojar los somas de dichas células, extendiendo sus axones hacia la sustancia blanca, donde contactan con los núcleos cerebelares, células en cesta y estrelladas (Kandel 2000). Finalmente, en la porción más interna, se localiza la capa de neuronas granulares, alojándose aquí los somas de dichas células. Estas células forman sinapsis con las fibras musgosas e interneuronas de Golgi (fig 1).



# Introducción

En el desarrollo del cerebelo, desde P5 y hasta P15, las CGC migran desde la capa granular externa a la capa granular interna (IGL), nicho de estas células en el estadio adulto. En este proceso migratorio, las CGC atraviesan la capa de neuronas de Purkinge asistidas por las prolongaciones de la glía de Bergmann (Xu *et al.* 2013).

A lo largo de esta etapa, la supervivencia de CGC está condicionada a la actividad sináptica, mediada por la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los receptores de NMDA (Jurado *et al.* 2003). El glutamato requerido para dicha actividad sináptica a lo largo del proceso migratorio procede de las aferencias de las fibras musgosas. Por esta razón, los cultivos de CGC realizados en el presente trabajo se llevan a cabo en presencia de 25 mM KCl a fin de emular las condiciones despolarizantes a las que se ven sometidas las CGC durante este proceso (Gallo *et al.* 1987).

Concomitantemente al proceso de migración hacia la IGL, las CGCs prolongan su axón hacia la capa molecular del cerebelo (Xu *et al.* 2013), donde éste se ramifica en forma de "T" (Espinosa & Luo 2008, Xu *et al.* 2013) y establece contactos sinápticos con el árbol dendrítico de las neuronas de Purkinge. A partir de P15, prácticamente la totalidad de las neuronas de EGL han migrado a IGL, habiendo desaparecido la primera de las capas y dando como resultado la estructura trilaminar aludida, propia del estadio adulto (fig 1).

## 2.1.2. La corteza cerebral

La corteza cerebral o "cortex cerebral", es la región del encéfalo que recubre los hemisferios cerebrales, compuesta en su mayoría de materia gris. Desde el punto de vista evolutivo, es la porción del cerebro más desarrollada en lo que a procesamiento de información neuronal respecta. La corteza actúa como centro integrador y procesador de estímulos, haciendo posible la percepción sensorial, el pensamiento, la función motora voluntaria y el lenguaje (Valverde 2002). Dichas funciones se encuentran localizadas en áreas sensoriales (de aferencia talámica) y motoras (de aferencia motora espinal) perfectamente delimitadas en su superficie (Kandel 2000), pudiéndose hablar de un verdadero "mapeo" de la corteza cerebral (Valverde 2002).

# Introducción

## 2.1.2.1. Citoarquitectura y organización funcional de la corteza cerebral

Desde el punto de vista citológico, las células integrantes de la corteza cerebral se pueden clasificar en tres grandes grupos atendiendo a su función: neuronas piramidales excitatorias, interneuronas o neuronas inhibitorias y células de glía (Kandel 2000).

Las células piramidales constituyen el 70% de la población total de neuronas, localizándose preferentemente en las capas II/III, V y VI de la corteza cerebral (fig 2). Deben su nombre a la morfología piramidal del soma, presentado éste además una dendrita apical que se ramifica en la capas superiores de la corteza, dando lugar a las fibras colaterales. Estos procesos neurológicos se caracterizan por una alta densidad de espinas dendríticas, siendo dichas estructuras elementos dotados de gran plasticidad sináptica, responsables, en último término, de la gran complejidad de conexiones sinápticas que establecen las neuronas piramidales (Ramón y Cajal 1893). Poseen un largo axón mielinizado descendente en la base, que puede ser de proyección intrínseca o proyectarse en la materia blanca hacia zonas subcorticales (Valverde 2002). Dichas células portan como principal neurotransmisor glutamato, con función excitadora (Conti *et al.* 1987, DeFelipe *et al.* 1988, Conti *et al.* 1989). Pese a que las neuronas piramidales representan la vasta mayoría de neuronas excitatorias en el cerebro, a éstas se añaden las neuronas bipolares, quienes establecen sinapsis activadoras sobre las dendritas de las neuronas piramidales (Peters & Connor 1983) y las células estrelladas. Las células estrelladas presentan dendritas cubiertas de espinas, al igual que las células piramidales (LeVay 1973) y componen el principal elemento receptor de las fibras aferentes del tálamo (Valverde 2002).

Por su parte, las interneuronas, pese a su relevancia fisiológica en la modulación de la respuesta eléctrica, apenas representan el 30% del linaje neuronal (Valverde 2002). Existe una gran variedad de interneuronas inhibitorias en lo que a morfología celular respecta, siendo todas ellas liberadoras de GABA, principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central. Entre ellas se encuentran las células de Golgi, células de Martinotti, células en cesta, neuronas en candelabro, neuronas bipenachadas y neuronas en ovillo (Valverde 2002). Las neuronas de Golgi, de axón corto y distribución homogénea en toda la corteza cerebral (Lorente de Nó 1922, Lorente de Nó 1934), conforman una población de células sin aparente uniformidad morfológica, siendo muy abundantes en la corteza visual (Ruiz-Marcos & Valverde 1970, Valverde 1976, Feldman & Peters 1978, Fairen & Valverde 1979). Las células de Martinotti,

## Introducción

inicialmente descritas por Cajal, (Ramón y Cajal 1911) son interneuronas de axón ascendente situadas en las capas más profundas de la corteza cerebral (O'Leary 1941, Lund 1973). Su función se ha relacionado con mecanismos antiepilépticos al activarse dichas neuronas inhibitorias como consecuencia de la sobreexcitación de las neuronas piramidales. Las células en cesta, descritas por primera vez por Cajal, (Ramón y Cajal 1911) son interneuronas multipolares con dendritas lisas y axón desarrollado en largas fibras colaterales cuyas ramificaciones terminales forman nidos o cestas sobre las dendritas de las neuronas piramidales (Valverde 2002). Estas interneuronas son activadas directamente por aferencia talámica, y dada su potente acción inhibitoria sobre poblaciones de células piramidales, se ha propuesto que su activación en la corteza produce la inhibición de poblaciones de células piramidales vecinas con similares campos receptivos (Mountcastle & Powell 1959). Al igual que para las células de Martinotti, su ausencia se ha relacionado con la propensión a episodios epilépticos (Marco *et al.* 1996, Marco & DeFelipe 1997, DeFelipe *et al.* 2001). Las neuronas en candelabro, así denominadas por el parecido físico de los botones sinápticos de las fibras axónicas terminales y los candiles de las lámparas de brazos, se describieron por primera vez en *gyrus cinguli* de gato (Szentagothai & Arbib 1974). Dichas neuronas forman sinapsis inhibitorias con los segmentos iniciales axónicos de las células piramidales (Fairen *et al.* 1977), por lo que también se han denominado como "células axoaxónicas" (Somogyi 1977). Las células bipenachadas, inicialmente descritas por Cajal, fueron denominadas en la nomenclatura anglosajona como "double bouquet cells" en alusión a su particular morfología (Ramón y Cajal 1911). Se caracterizan por presentar un doble penacho dendrítico, ascendente y descendente con orientación radial y perpendicular a la piamadre, y una densa arborización axonal. Estas neuronas forman contactos inhibitorios sobre las dendritas basales y colaterales de las fibras apicales de las células piramidales (Somogyi & Cowey 1981, DeFelipe & Jones 1992). Debido a la disposición radial de sus axones, se ha postulado que éstos pudieran formar agregados "microcolumnares" a modo de componentes integrantes de la organización columnar de la corteza (Somogyi *et al.* 1981). Las células en ovillo, también conocidas como "neuroglíaformes" o "en tela de araña" constituyen una población de interneuronas de pequeño tamaño, con dendritas lisas y un axón que se ramifica en un tupido ovillo de colaterales formando un plexo alrededor del soma. Se observaron inicialmente en la corteza visual de gato (Fairen & Valverde 1979), habiéndose descrito su acción inhibitoria sobre las dendritas de las células estrelladas con espinas (Kisvarday *et al.* 1986).

## Introducción

Estas células, con carácter general, se disponen de forma estratificada en 6 capas, numeradas como I, II/III, IV, V y VI desde el exterior al interior (Valverde 2002), recibiendo inervación aferente de regiones corticales o talámicas (Lorente de Nó 1922, Lorente de Nó 1949)(fig 2).

- Capa I o Plexiforme: caracterizada por el denso entramado de la arborización dendrítica de las capas II/III y su baja densidad celular.
- Capa II/III: alberga los somas de las neuronas piramidales pequeñas y medianas respectivamente. La capa II también es conocida como "capa granular externa".
- Capa IV o capa granular interna: aloja los somas de las neuronas granulares y las células estrelladas.
- Capa V o de las células piramidales grandes.
- Capa VI o capa multiforme, aludiendo a la heterogeneidad de morfología celular. Entre ellas predominan las células fusiformes.

Las neuronas piramidales residentes en las capas II/III proyectan a zonas del mismo hemisferio cerebral o el cuerpo calloso (White & DeAmicis 1977, Olavarria & Van Sluyters 1985, White & Czeiger 1991), mientras que las células piramidales de las capas V y VI lo hacen, preferentemente, hacia zonas subcorticales, tal y como ha sugerido el uso de diferentes trazadores (Jacobson & Trojanowski 1975, Gilbert & Kelly 1975, White & DeAmicis 1977).

# Introducción

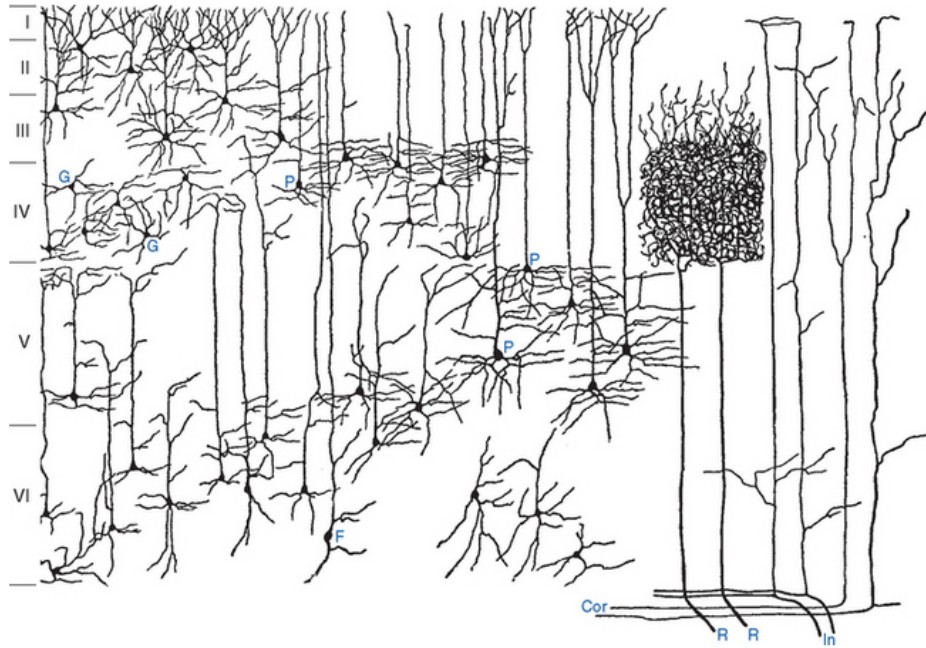


Figura 2: Tinción de Golgi de la corteza cerebral mostrando la estratificación de las células corticales en las capas I-VI y las aferencias corticales y talámicas. G: célula granular; P: célula piramidal; F: células fusiformes; Cor: aferencias corticales; R: aferencias de estación de relevo talámico; In: aferencia intratalámica. Reproducido de Lorente de Nó 1949.

A nivel funcional, la corteza cerebral se estructura de forma modular gracias a la existencia de unidades elementales conocidas como "columnas de dominancia". Este concepto, introducido inicialmente por Lorente de Nó (Lorente de Nó 1949), establece un patrón de conectividad intrínseca dentro de un cilindro vertical de la corteza o "columna de dominancia" (Hubel & Wiesel 1969). Dicha estructura elemental porta como eje central una fibra aferente talámica y todos los elementos capaces de desarrollar el proceso completo de transmisión hasta la fibra de proyección cortical (Valverde 2002). Esta organización funcional posibilita el procesamiento independiente y en paralelo de la información sensorial de múltiples vías de transmisión.

## 2.1.2.2. Fisiopatología de la corteza cerebral

Las espinas dendríticas son estructuras dinámicas, dotadas de gran plasticidad sináptica, con un papel decisivo en los procesos de aprendizaje (Geinisman 2000,

# Introducción

Geinisman *et al.* 2001) y memoria (Rausch & Scheich 1982, Patel *et al.* 1988). Dichas estructuras desaparecen progresivamente como resultado de episodios isquémicos y reaparecen tras su cese (Hasbani *et al.* 2001), lo que reafirma su carácter dinámico. Con frecuencia, su número y morfología aparecen alteradas en enfermedades mentales como la esquizofrenia (Garey *et al.* 1998, Glantz & Lewis 2000), y numerosos síndromes asociados a trastornos cognitivos (Multani *et al.* 1994, Anderson & Rutledge 1996, Kaufmann & Moser 2000). Un caso particular de trastorno cognitivo es el síndrome del X frágil, caracterizado por un incremento aberrante de la densidad de espinas dendríticas hipofuncionales en corteza cerebral, aunque también en otras regiones del cerebro como el hipocampo o el cerebelo (Bagni & Greenough 2005, Dolan *et al.* 2013). Dicha patología, objeto de estudio del presente trabajo, es ampliada en el capítulo 4.

## 2.2. La sinapsis glutamatérgica

La neurotransmisión o comunicación entre neuronas es un requisito indispensable para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central (SNC), teniendo lugar estos procesos en regiones neuronales fácilmente reconocibles denominadas "sinapsis". La palabra sinapsis deriva del griego [sýnapsis] y hace referencia a "unión" o "enlace", en alusión a la comunicación intercelular que se establece entre la célula emisora y receptora del impulso nervioso. Clásicamente, se distinguen dos tipos de sinapsis en función de si existe o no comunicación física directa entre la célula presináptica y postsináptica: sinapsis eléctricas y sinapsis químicas. Las sinapsis eléctricas, propias de organismos inferiores en la escala evolutiva, basan la neurotransmisión en la continuidad física entre los compartimentos pre-y postsináptico. Están formadas por uniones de tipo "gap" que ponen en contacto los citoplasmas de ambas células y a través de los cuales fluyen los iones (Pereda 2014).

El segundo tipo, las sinapsis químicas, se caracterizan por una separación física entre la célula pre-y postsináptica, denominada "hendidura o brecha sináptica" con una anchura promedio de 30 nm. Esta discontinuidad física en el proceso de neurotransmisión hace necesario la liberación de un mensajero químico, conocido como neurotransmisor, a la brecha sináptica y su posterior unión a receptores específicos en las dendritas de la célula postsináptica. El neurotransmisor se

## Introducción

encuentra almacenado en el interior de vesículas sinápticas (VSs), presentes en la porción más distal del axón conocida como "terminales sinápticos" (Kandel 2000).

La neurotransmisión se inicia con la recepción de un potencial de acción en el terminal presináptico. Esta onda de despolarización conlleva la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje en el terminal y la entrada de calcio a favor de gradiente de concentración. El calcio en el interior del terminal sináptico promueve la fusión de las vesículas con la membrana plasmática y la consiguiente liberación del neurotransmisor a la hendidura sináptica. El neurotransmisor difunde y se une a receptores ionotrópicos específicos para dicho ligando en la membrana de la célula postsináptica, donde su activación aumentará la conductancia para cationes sodio ( $\text{Na}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que iniciará una nueva onda de despolarización en la célula postsináptica. Esta secuencia de eventos, aunque finamente regulada, transcurre en un intervalo de tiempo de 1-2 ms (Kandel 2000), lo que garantiza la fidelidad y extrema rapidez de la transmisión nerviosa (fig 3).

En las neuronas del sistema nervioso central, el principal neurotransmisor excitatorio es el L-glutamato. Esta molécula, de naturaleza aminoacídica, procede en su mayoría de la glutamina proporcionada por los pies astrocitarios que envuelven las sinapsis. La glutamina, por acción de la enzima glutaminasa rinde como producto de hidrólisis glutamato. Otra de las vías de aprovisionamiento de glutamato deriva de la transaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato proporcionado por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El glutamato es introducido en el interior de las vesículas de secreción gracias a la acción de los transportadores vesiculares para glutamato (vGluTs), pertenecientes a la familia de transportadores de soluto SLC17. Se han caracterizado 3 isoformas: vGluT1, vGluT2 y vGluT3, siendo vGluT1 (expresado en corteza cerebral, hipocampo y corteza cerebelar) y vGluT2 (expresado en tálamo, tronco encefálico y núcleos cerebelares) los más abundantes en cerebro (Takamori *et al.* 2001, Herzog *et al.* 2001, Fremeau *et al.* 2001). En el caso de vGluT1 y vGluT2 existe un alto grado de homología en su estructura primaria, pero interaccionan con proteínas diferentes, lo que, en última instancia, condiciona la cinética de reciclamiento de la vesícula portadora (Santos *et al.* 2014, Pan *et al.* 2015).

En el lumen de las vesículas sinápticas el glutamato se almacena a concentraciones de hasta 150 mM gracias a un proceso de carga mediante un antiporte acoplado a la disipación de un gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$ . Este gradiente es generado por la acción de las bombas ATPasas de las vesículas (V-ATPasas), que acoplan la hidrólisis

# Introducción

de ATP a la introducción de  $H^+$  en contra de gradiente electroquímico (Omote *et al.* 2011). Se genera, de este modo, una fuerza protón-motriz capaz de introducir el glutamato en el interior de las vesículas, siendo la diferencia de potencial transmembrana ( $\Delta\psi$ ) la principal componente del proceso (Bellocchio *et al.* 2000).

Una vez finalizada la carga del neurotransmisor en el interior de las vesículas, éstas se agrupan y se sitúan en las inmediaciones de la zona activa, próximas a canales de calcio, propiciando así el rápido acoplamiento entre la entrada de calcio y la maquinaria exocitótica (Sudhof 2013).

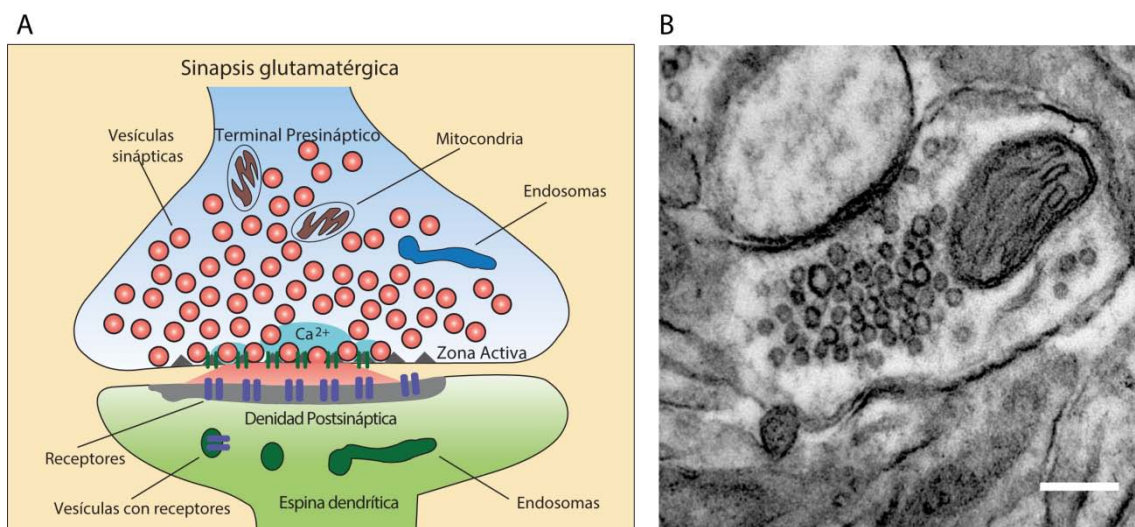


Figura 3: A) Esquema característico de una sinapsis glutamatérgica. Se muestra el terminal presináptico con las vesículas sinápticas agrupadas próximas a la zona activa, y en íntima aposición con éste, el compartimento postsináptico con los receptores para glutamato. Adaptado de Sudhof 2012. B) Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una sinapsis glutamatérgica. Barra de escala 200 nm.

## 2.2.1. La zona activa

La zona activa (ZA) hace alusión a la región especializada de la membrana plasmática donde tiene lugar la fusión de las vesículas sinápticas para la liberación del neurotransmisor a la brecha sináptica. Dicha región es fácilmente reconocible en micrografías electrónicas debido a la presencia de una intrincada red proteica

## Introducción

electrodensa en íntima aposición con la maquinaria presente en las espinas dendríticas postsinápticas (fig 4B-C), comúnmente conocido como "densidad postsináptica" o PSD (del inglés, *PostSynaptic Density*; (Michel *et al.* 2015).

La coordinación espacio-temporal de la transmisión sináptica es posible gracias a la fina regulación del proceso de fusión vesicular. Para ello, previo a la fusión de las vesículas tras la entrada de calcio por los canales de calcio sensibles a voltaje, las vesículas son reclutadas a la zona activa (Cole *et al.* 2016), colocadas en contacto físico directo con la ZA (ancladas o "docked"; (Imig *et al.* 2014) y sometidas a un proceso de maduración funcional, conocido como "priming" que les confiera competencia exocitótica plena (Sudhof 2013).

La zona activa, además del reclutamiento vesicular, participa en el reclutamiento de canales de calcio voltaje-dependientes a la membrana plasmática. Se consigue, de este modo, la creación de microdominios de calcio en las inmediaciones de las VS colocadas en la zona activa, lo que garantiza la extrema velocidad de la fusión calcio-dependiente ante la llegada de un potencial de acción (Sudhof 2013, Ackermann *et al.* 2015).

La maquinaria pre-y postsináptica se encuentran en perfecto alineamiento gracias a la existencia de una vasta colección de proteínas de adhesión celular que garantizan la correcta señalización y neurotransmisión, además de mantener la citoarquitectura de la sinapsis. Entre dichas moléculas se encuentran los pares neurexina (presináptica) - neuroligina (postsináptica; (Foldy *et al.* 2013), N-cadherinas (Uchida *et al.* 1996, Shetty *et al.* 2013, van Stegen *et al.* 2017), y Ephrinas (Zhao *et al.* 2018).

En última instancia, la zona activa participa en multitud de fenómenos de plasticidad sináptica, tanto a corto plazo (STP, del inglés *Short-Term Plasticity*) como a largo plazo (LTP, del inglés *Long-Term Plasticity*). A este respecto, pueden actuar respondiendo a la acción de segundos mensajeros tales como 1,2-di-acilglicerol (directamente implicado en procesos de plasticidad presináptica), o favoreciendo el reclutamiento de proteínas efectoras de dicha plasticidad (Ho *et al.* 2011, Sudhof 2012b).

# Introducción

## 2.2.1.1. Citoarquitectura de la zona activa

La zona activa está integrada por un denso entramado de proteínas difícil de disolver y purificar, con un marcado carácter electrodenso en imágenes de microscopía electrónica (fig 4B). El núcleo principal de dicha estructura está integrado por cinco proteínas conservadas evolutivamente: RIM (del inglés, *Rab 3 Interacting Molecule*), RIM-BP (del inglés, *Rab 3 Interacting Molecule Binding Protein*), Munc-13 (del inglés, *Mammalian homologue of UNCoordinated phenotype*), las proteínas ELKS/CAST (del inglés, *Cytomatrix at the Active zone STRUCTURAL Protein*) y  $\alpha$ -liprinas (Sudhof 2012b). A este núcleo proteico conservado se añaden dos más en organismos vertebrados: Piccolo y Bassoon (tom Dieck *et al.* 1998). Se trata de dos proteínas de gran tamaño con función de andamiaje en la zona activa, cuyas prolongaciones se extienden varios nm hacia el interior del terminal sináptico (Gundelfinger *et al.* 2015). Ambas juegan un papel clave en la organización estructural de la zona activa, uniéndose y estabilizando a múltiples proteínas de ZA debido a su naturaleza modular (fig 4A). Entre las proteínas con las que interactúan se encuentran Munc-13, RIM-BP, CAST y/o canales de calcio sensibles a voltaje (Davydova *et al.* 2014). Piccolo además participa en el ensamblaje dinámico del citoesqueleto de actina al interactuar con las proteínas Abp1 (del inglés, *Actin binding protein 1*; (Fenster *et al.* 2003), Daam1 o GIT1 (Waites *et al.* 2011, Wagh *et al.* 2015), lo que redundará en la estabilización de los filamentos de actina presináptica y en el mantenimiento de la citoarquitectura de la ZA.

Este entramado proteico se manifiesta en imágenes de microscopía electrónica dando lugar a un aspecto característico de rejillas hexagonales, formadas por las proyecciones electrodensas de las proteínas de citomatrix y las vesículas sinápticas intercaladas en su interior (Limbach *et al.* 2011). Estudios de ultraestructura combinados con inmunodetección han revelado que las proteínas Munc-13 y RIM se localizan en las inmediaciones de la ZA. Este hecho tiene sentido dado el papel de RIM en el amarre de vesículas sinápticas a la zona activa y el reclutamiento de canales de calcio en las inmediaciones de éstas.

# Introducción

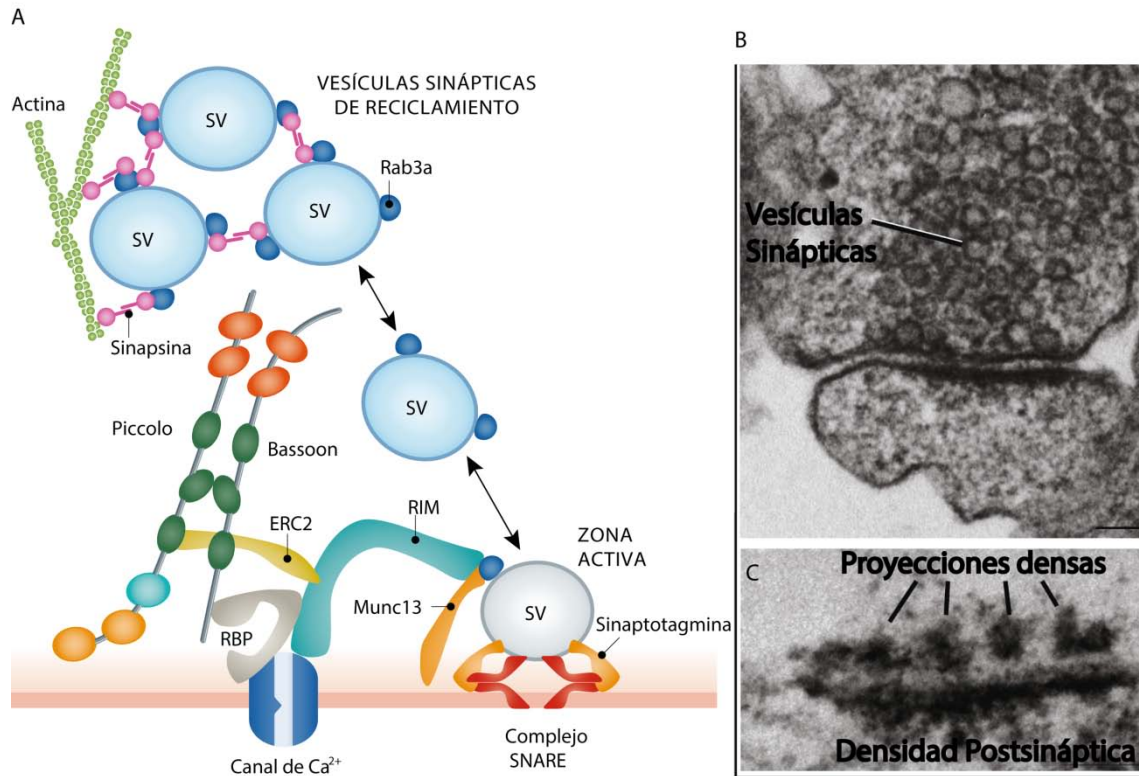


Figura 4: A) Esquema gráfico de la citomatrix en la zona activa. Se muestra la relación espacial de las principales proteínas de citomatrix y su interacción con las vesículas sinápticas y los canales de calcio sensibles a voltaje, mediando en los procesos de reclutamiento de VSs a zona activa, anclaje a membrana ("docking") y preparación funcional del complejo SNARE para la liberación vesicular ("priming"). Adaptado de Ackermann *et al.* 2015. B) Micrografía electrónica de una sinapsis de neurona de hipocampo cultivada. C) Detalle de la densidad postsináptica (PSD) y las proyecciones electrodensas de la citomatrix en la presinapsis. B y C adaptado de Kaeser *et al.* 2011.

## 2.2.2. Organización de vesículas en pools

El concepto de "pool" fue introducido por primera vez por Robertis y Bennett (Derobertis & Bennett 1955) para clasificar la totalidad de las vesículas presentes en un terminal en diferentes poblaciones, atendiendo a su probabilidad de liberación (Rizzoli & Betz 2005, Denker & Rizzoli 2010, Fowler & Staras 2015).

Las primeras evidencias funcionales de esta subdivisión vesicular se obtuvieron en estudios realizados en ganglio de gato, donde se observó una probabilidad de

## Introducción

liberación vesicular diferente entre distintas vesículas (Birks & Macintosh 1961). Posteriormente, análisis ultraestructurales de neuronas de hipocampo, revelaron una segregación espacial entre VSs próximas a la zona activa y otro subconjunto de éstas más alejadas de la zona activa (Schikorski & Stevens 1997).

La clasificación aceptada actualmente contempla una subdivisión de la población total de vesículas en 3 grupos o "pools": las vesículas de inmediata liberación ante la llegada de un potencial de acción o una estimulación mínima constituyen el "RRP" (del inglés, *Readily Releasable Pool*), el subconjunto de vesículas que bajo condiciones de estimulación intensas y prolongadas pueden alcanzar la zona activa y participar en la exocitosis "Recycling Pool" (RP) o vesículas de reciclamiento y el subconjunto de vesículas de reserva o "Resting Pool" (RtP), integrado por aquellas vesículas que no participan en el evento excitotóxico (Betz *et al.* 1992, Betz & Bewick 1992, Denker & Rizzoli 2010, Denker *et al.* 2011a, Alabi & Tsien 2013, Fowler & Staras 2015). Las vesículas del RRP y el pool de reciclamiento constituyen la fracción total de vesículas con capacidad de reciclamiento, acuñándose el acrónimo TRP (del inglés, Total Recycling Pool; fig 5) (Fowler & Staras 2015).

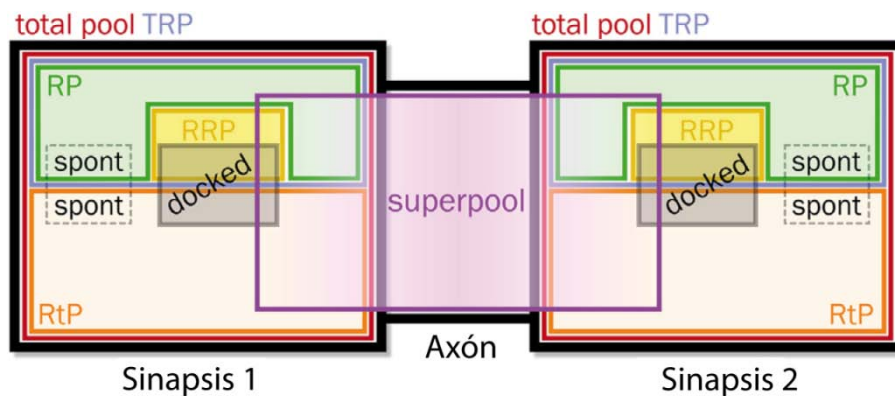


Figura 5: Esquema de la organización de los pools vesiculares y su interrelación. Se muestran dos sinapsis con la distribución espacial de los pools y la compartición de vesículas en tránsito por las fibras axónicas entre botones sinápticos a través del "superpool". TRP: Total Recycling Pool; RP: Recycling Pool; RtP: Resting Pool; RRP: Readily Releasabe Pool; Spont: vesículas de fusión espontánea; Docked: vesículas ancladas a la zona activa. Adaptado de Fowler & Staras 2015.

## Introducción

Las vesículas integrantes del RRP son las que presentan mayor probabilidad de liberación debido a que están funcionalmente preparadas para fusionarse con la membrana plasmática ante la llegada de un estímulo (Kaeser & Regehr 2017). De este modo, su liberación puede inducirse mediante una estimulación eléctrica mínima (300 AP 30 Hz en unión neuromuscular de rana (Rizzoli & Betz 2004); 40 PA a 20 Hz en neuronas de hipocampo de ratón (Rey *et al.* 2015, Kaeser & Regehr 2017), o perfusión de sacarosa (Rosenmund & Stevens 1996). El tamaño relativo de dicha fracción vesicular puede variar entre diferentes modelos neuronales, dependiendo de la aproximación metodológica empleada e incluso entre terminales de la misma neurona (Welzel *et al.* 2011). Varios estudios, empleando técnicas de electrofisiología, sugieren un tamaño relativo de aproximadamente un 15% del pool total (Richards *et al.* 2000, Richards *et al.* 2003, Richards *et al.* 2004). El empleo de técnicas de imagen en célula viva transfectadas con pHluorinas revela un promedio de 4 vesículas por zona activa (Ariel & Ryan 2010, Rey *et al.* 2015).

Se ha postulado que las vesículas amarradas a la zona activa o "docked" son el correlato ultraestructural del RRP (Schikorski & Stevens 2001). Sin embargo, las vesículas que integran el RRP, además de dicho requerimiento morfológico precisan del paso de maduración funcional o "priming" que las hace competentes para su inmediata liberación, lo que ha supuesto un cambio de paradigma al considerar que no todas las vesículas "docked" componen el RRP (Fowler & Staras 2015, Kaeser & Regehr 2017)(fig 5).

Las vesículas que componen el RRP no conforman un compartimento estanco, ya que sucesivas estimulaciones conducentes a su marcaje y liberación han demostrado que si bien existe un reciclamiento preferente de esta población de vesículas, no son las mismas en su totalidad (Rey *et al.* 2015).

El pool de reciclamiento o "recycling pool" lo conforman todas aquellas vesículas con capacidad para fusionarse con la membrana y ser posteriormente endocitadas (Denker & Rizzoli 2010, Fowler & Staras 2015). Su tamaño relativo varía en función del estadio de maduración celular (Bartolome-Martin *et al.* 2012) y del modelo neuronal estudiado (Becherer & Rettig 2006). Al margen de dichas diferencias, la estimación del tamaño relativo de cada uno de ellos para un mismo modelo celular se ve sesgada por las herramientas metodológicas empleadas para su estudio. De este modo, mediante técnicas de imagen en célula viva transfectadas con moléculas de pHluorina, se ha estimado un tamaño relativo de dicha población próximo al 50% del total (Orenbuch *et*

## Introducción

*al.* 2012), mientras que técnicas de microscopía electrónica estiman un tamaño promedio no superior al 20% del pool total (Schikorski & Stevens 2001)(fig 6). Empíricamente, en los estudios abordados en el presente trabajo, se ha estimado un tamaño promedio del RP del 50% en neuronas granulares de cerebelo de rata transfectadas con vGluT1-pHluorina (Ramperez *et al.* 2017) y del 70% mediante fotomarcaje de vesículas combinado con microscopía electrónica.

Respecto a la identidad de las vesículas pertenecientes al RP se ha identificado a VGLUT1 y VAMP2 como marcadores moleculares de las vesículas con capacidad de reciclamiento (Hua *et al.* 2011, Bykhovskaia 2011). Sin embargo, el pool de reciclamiento y el de reserva no son compartimentos estancos e intercambian VSs entre sí (Fowler & Staras 2015).

El pool de reserva o "Resting Pool" (RtP) está constituido por aquellas vesículas que no participan en el ciclo vesicular en condiciones normales de estimulación (Denker & Rizzoli 2010, Denker *et al.* 2011a).

Su presencia y funcionalidad es un tema controvertido, ya que tanto las vesículas del RP como las del RtP se entremezclan entre sí, sin mostrar diferencias en su distribución (Rizzoli & Betz 2005, Fowler & Staras 2015)(fig 6). Se ha postulado que esta población de VSs pudiera actuar como un reservorio de proteínas sinápticas en las sinapsis (Denker *et al.* 2011b) o que su movilización tuviese lugar en eventos de liberación espontánea (Sara *et al.* 2005, Fredj & Burrone 2009). A favor de esta última hipótesis, algunos autores postulan que dicha población de vesículas deriva de la vía de reciclaje endosomal, mostrando éstas marcadores moleculares característicos de la liberación asincrónica tales como VAMP-4 (Nicholson-Fish *et al.* 2015, Nicholson-Fish *et al.* 2016) y Syt-7 (Li *et al.* 2017).

# Introducción

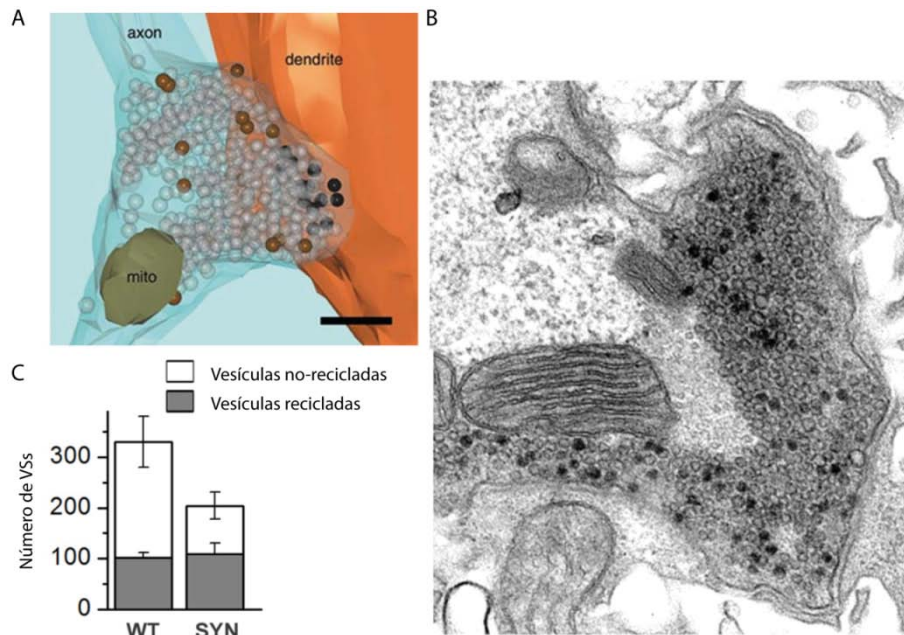


Figura 6: Las vesículas del pool de reciclamiento y de reserva se distribuyen homogéneamente dentro de un terminal. A) Reconstrucción tridimensional de una sinapsis de hipocampo mostrando las VSs del RRP (esferas negras), vesículas del RP (esferas marrones) y VSs del RtP (esferas transparentes). Adaptado de Schikorski & Stevens, 2001. B) Micrografía electrónica de unión neuromuscular de *Drosophila* con marcaje selectivo mediante fotoconversión para las vesículas recicladas (Recycling Pool; VSs electrodensas) en contraposición a las VSs del pool de reserva (vesículas claras). Nótese la ausencia de segregación espacial entre las vesículas de ambos pools. C) Cuantificación del número de VSs totales y pertenecientes a los pools de reciclamiento (porción sombreada en gris) y pool de reserva (porción blanca) en terminales WT y carentes de sinapsina ( $Syn^{-/-}$ ). Apréciese la drástica reducción de la población de vesículas de reserva como resultado de la ausencia de sinapsina. Figura adaptada de Bykhovskaia 2011.

Sin embargo, la pertenencia de una vesícula al RtP o RP no parece tener una vinculación definitiva, ya que se ha descrito que la actividad de la proteína fosfatasa PP2B ó calcineurina aumenta el tamaño del RP en detrimento del RtP (Kim & Ryan 2013) y el efecto antagónico es mediado por CDK5 (Kim & Ryan 2010). El sustrato diana de estas dos actividades enzimáticas radica en la familia de proteínas Sinapsina (Benfenati *et al.* 1989b, Akbergenova & Bykhovskaia 2010, Pechstein & Shupliakov 2010), siendo su estado de fosforilación determinante para la unión de estas proteínas

## Introducción

entre sí y con el citoesqueleto de actina (Pechstein & Shupliakov 2010, Shupliakov *et al.* 2011).

Las sinapsinas son proteínas presinápticas de naturaleza modular, siendo la familia de fosfoproteínas más abundantes en el cerebro (Benfenati *et al.* 1989a). Se han descrito en total 10 isoformas de sinapsina originadas a partir de 3 genes diferentes mediante corte y empalme alternativo de intrones (Evergren *et al.* 2007). De entre todas ellas, sinapsina I es la más abundante en cerebro y su regulación ha sido la más extensamente estudiada. Todas ellas juegan un papel decisivo en la unión de las VSs entre sí, y de éstas con el citoesqueleto de actina (Pechstein & Shupliakov 2010), estando regulado este proceso por su estado de fosforilación, proceso en el que intervienen múltiples quinasas (Chi *et al.* 2003, Shupliakov *et al.* 2011).

La estimulación neuronal, promueve la defosforilación de sinapsina disminuyendo su afinidad por las vesículas y propiciando, así, su disociación y la liberación de las VSs del RtP para que éstas puedan participar en el ciclo vesicular (Evergren *et al.* 2007, Shupliakov *et al.* 2011, Orenbuch *et al.* 2012, Fornasiero *et al.* 2012). Se inicia así el ciclo de la sinapsina, movilizándose estas moléculas a la zona activa para participar en la exocitosis y posteriormente re-asociarse con las VSs y los filamentos de actina polimerizados tras el cese del estímulo en la zona periactiva (Bloom *et al.* 2003) (fig 7D). En este ciclo, el aumento de calcio dependiente del estímulo activa a CaMKII (Chi *et al.* 2001) y calcineurina promoviendo la liberación de sinapsina de las VS (Kim & Ryan 2013). Sinapsina I, en condiciones de reposo, se encuentra fosforilada, por MAPK I, en un residuo de serina, siendo eliminado dicho grupo fosfato por la calcineurina (Jovanovic *et al.* 2001). A su vez, CDK5 parece ser la quinasa responsable del reagrupamiento vesicular tras la estimulación y su incorporación al RtP (Kim & Ryan 2010).

La clasificación de VSs en 3 subpoblaciones se ha visto recientemente actualizada con la introducción del concepto del "superpool". Este concepto hace referencia a la fracción de vesículas en tránsito a lo largo de las fibras axónicas que pueden ser compartidas entre distintos terminales (Darcy *et al.* 2006, Westphal *et al.* 2008). Las primeras evidencias de este particular movimiento de vesículas se obtuvieron en botones "*en passant*" situados a lo largo del axón (Harata *et al.* 2001, Fernandez-Alfonso & Ryan 2008, Branco *et al.* 2010). Se ha descrito que la movilidad intersináptica del RtP está regulada por sinapsina, resultando la delección de sinapsina Ia (Shupliakov *et al.* 2011, Versteegen *et al.* 2014), sinapsina IIa (Shulman *et*

## Introducción

*al.* 2015) o el triple *knock-out* en una notable reducción del RtP y, concomitantemente, un drástico aumento del superpool (Fornasiero *et al.* 2012, Orenbuch *et al.* 2012) (fig 7A-B). Un aspecto relevante en relación con el movimiento de las VSs del superpool es su alta demanda energética, ya que el desplazamiento a lo largo de las fibras axónicas es dependiente de las ATPasas motoras dineína y kinesina (Gennerich & Vale 2009). Habida cuenta de la ausencia de mitocondrias en los axones, la vía glicolítica se postula como la fuente de ATP que satisface dicha demanda energética. A este respecto, se ha descrito la presencia de GAPDH asociada a las VSs a través de la proteína Hungtintina (Zala *et al.* 2013).

En lo que respecta a la organización y el mantenimiento de los pools vesiculares, un aspecto de gran relevancia es comprender como éstos se mantienen unidos y segregados del resto de orgánulos y estructuras celulares en ausencia de una membrana lipídica. Está ampliamente descrito que diversas proteínas vesiculares mantienen las VSs unidas entre sí (Fernandez-Busnadiego *et al.* 2010, Denker *et al.* 2011a, Sudhof 2012b, Gundelfinger *et al.* 2015). Entre ellas se encuentran las ya mencionadas sinapsinas (Benfenati *et al.* 1989a, Chi *et al.* 2003, Pechstein & Shupliakov 2010, Shupliakov *et al.* 2011), que mantienen unidas las VSs mediante homo- o heterodimerización. Además de las sinapsinas, diversas proteínas con dominios SH3 y F-BAR tales como amfifisina, intersectina o endofilina (Evergren *et al.* 2004, Shupliakov 2009), e incluso, el propio transportador vesicular de glutamato (Siksou *et al.* 2013) o dinamina-1 (Evergren *et al.* 2007) median en la interacción proteína-proteína, haciendo de todo este entramado proteico verdaderos conectores vesiculares (Denker *et al.* 2011a) (fig 7C). Esta idea, ha ilustrado la hipótesis de la existencia de distintas fases líquidas en el citoplasma (Betz *et al.* 1992), estableciendo que si bien las uniones entre VSs de naturaleza proteica contribuyen a la segregación espacial de VSs, el intercambio dinámico de éstas entre los diferentes pools puede ser regulado por fosforilación/desfosforilación de dichas proteínas (Gaffield *et al.* 2006, Milovanovic & De Camilli 2017).

# Introducción

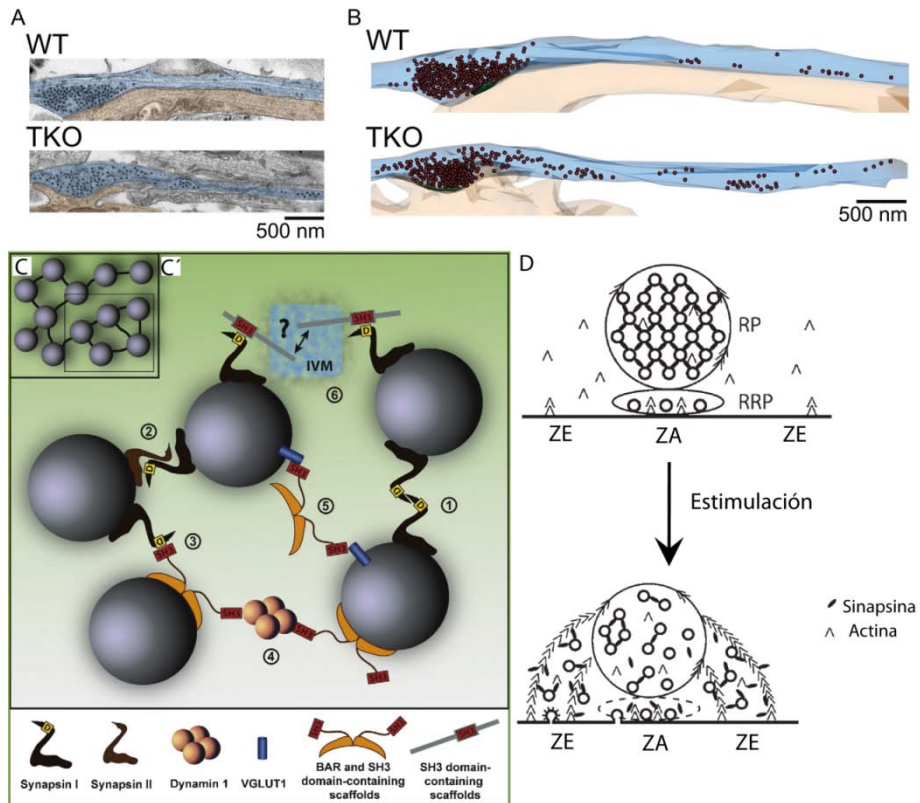


Figura 7: Sinapsina es fundamental para el mantenimiento del pool de reserva. A) Micrografía electrónica de un terminal sináptico y fibra axónica adyacente WT (panel superior) y carente de los 3 genes de sinapsina (TKO; panel inferior). B) Reconstrucción tridimensional de las sinapsis mostradas en a. A y B adaptados de Orenbuch *et al*, 2012. C) Esquema de la organización de vesículas sinápticas en el pool de reserva. C') Detalle ampliado de C mostrando los conectores proteicos que mantienen unidas las VSs. IVM: del inglés, *Inter Vesicular Matrix*; SH3: dominio de interacción con proteínas ricas en prolina; D) dominio proteico de sinapsina I regulado por fosforilación. Adaptado de Shupliakov *et al*, 2011. D) Esquema del ciclo de sinapsina en condiciones de reposo (panel superior) y tras la estimulación neuronal (panel inferior). Nótese la dispersión vesicular acontecida tras la estimulación y la localización de sinapsina en las zonas de endocitosis en asociación con los filamentos de actina. ZE: Zona Endocítica; ZA: Zona Activa. Adaptado de Evergren *et al*. 2007.

## 2.2.3. Ciclo vesicular sináptico

Se entiende por ciclo vesicular el conjunto de etapas que componen la completa adquisición de competencia excitotóxica de una vesícula, su fusión con la membrana plasmática (exocitosis), posterior reciclamiento o retracción de la membrana

# Introducción

(endocitosis) y los procesos de reacidificación del lumen vesicular para el subsiguiente rellenado de neurotransmisor en su interior (Valtorta *et al.* 1989, Betz & Bewick 1992, Zimmermann *et al.* 1993, Sudhof 2004). En las siguientes secciones se detallarán los procesos de exocitosis, haciendo especial hincapié en los procesos de preparación molecular de las vesículas, y las diferentes formas de endocitosis.

## 2.2.3.1. Exocitosis

El término exocitosis hace alusión a la liberación del contenido vesicular (neurotransmisor) como resultado de la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. Con anterioridad a este evento, las VSs experimentan un proceso de acercamiento y anclaje a la membrana plasmática, "docking", y seguidamente un paso de maduración funcional o "priming", que comprende el ensamblaje del complejo SNARE (del inglés, *Soluble NSF Attachment protein REceptor*) que les confiere competencia exocitótica plena para su inmediata liberación ante una elevación transitoria de calcio en el terminal sináptico (Sudhof 2012a).

Las proteínas que integran el complejo SNARE están altamente conservadas a lo largo de la evolución debido a su participación en multitud de vías de tráfico vesicular. De entre todas ellas, las 3 que componen la maquinaria exocitótica han sido las más estudiadas y mejor caracterizadas: la proteína de la membrana vesicular sináptica sinaptobrevina o VAMP (del inglés, *Vesicle Associated Membrane Protein*), y las proteínas residentes en la membrana plasmática Sintaxina-1 y SNAP-25 (Fasshauer *et al.* 1998) (fig 8B).

El ensamblaje del complejo SNARE supone la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática, haciendo de este modo posible la exocitosis. El complejo SNARE está formado por una superhélice de 4  $\alpha$ -hélices de las tres proteínas aludidas previamente, perteneciendo dos de ellas a SNAP-25, una a sintaxina-1 y otra a sinaptobrevina (Sutton *et al.* 1998) (fig 8B). Entre las  $\alpha$ -hélices de las proteínas SNARE se establecen, mayoritariamente, interacciones hidrofóbicas (Fasshauer *et al.* 1998), en sentido amino a carboxilo terminal, a través de sus dominios SNARE (fig 8A). El ensamblaje de este complejo deviene en una drástica reducción de la energía libre de Gibbs, permitiendo acoplar este proceso a otro termodinámicamente desfavorecido como lo es la fusión de las membranas vesicular y plasmática. Este

# Introducción

modelo convierte al complejo SNARE en un verdadero motor del proceso excitotico (Jahn & Scheller 2006, Sudhof & Rizo 2011).

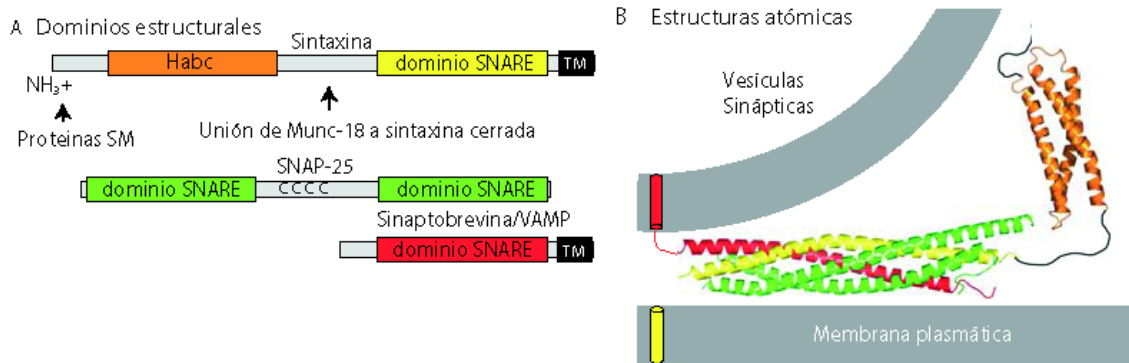


Figura 8: Proteínas integrantes del complejo SNARE. A) Estructura modular de las proteínas SNARE, mostrándose el dominio SNARE de interacción alineado y los sitios de unión de otras proteínas implicadas en el "priming". B) Esquema de la distribución espacial del complejo SNARE ensamblado en "trans" (véase más adelante). Adaptado de Südhof & Rizo 2011.

## 2.2.3.1.1. Preparación de las vesículas: "Docking y Priming"

Con anterioridad a la fusión calcio-dependiente de las VSs, dichos orgánulos han de experimentar un proceso de adquisición de competencia excitotica. En esta etapa preparatoria se distinguen dos procesos: un acercamiento espacial de las vesículas a la zona activa y un amarre de éstas a la membrana plasmática donde se generan los microdominios de calcio, conocido como "docking", y un paso posterior de ensamblaje del complejo SNARE conocido como "priming" (Sudhof 2012a).

En este proceso preparatorio de las VSs cobran especial protagonismo 4 proteínas con un papel decisivo: RIM, Munc-13, Rab3/27 y la proteína de la familia SM (del inglés, *Sec1/Munc-18 like*) Munc-18 (Hata *et al.* 1993). Munc-13 participa directamente tanto en los procesos de "docking" como en el "priming" (Jahn & Fasshauer 2012). RIM es responsable de la localización espacial de las VSs próximas a los canales de calcio, ya que interacciona con la proteína de la vesícula Rab3 (Dulubova *et al.* 2005) y con los canales de calcio de forma dual, directamente y a través de RIM-BP (Kaeser *et al.* 2011). Además, RIM participa en la activación de Munc-13 al formar con éste un

## Introducción

complejo heterodimérico, desplazando así la forma homodimérica inactiva de Munc-13. A su vez, Munc-13 es activado de forma dual por  $\text{Ca}^{2+}$  gracias a su unión a los dominios C2 y por 1,2-diacilglicerol, uniéndose a los dominios C1. Esta regulación permite su activación de forma paralela a la translocación a membrana. Por último, Munc-18 interviene en los pasos finales de preparación de las VSs al interactuar con una forma semicerrada de sintaxina-1 (Dulubova *et al.* 1999), facilitando el inicio de la formación del complejo SNARE (Shen *et al.* 2007) (fig 9).

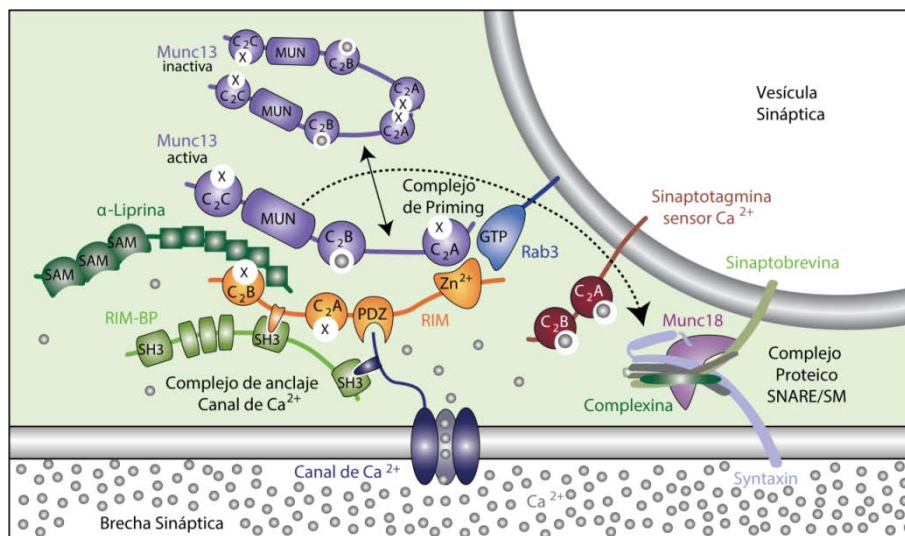


Figura 9: Esquema gráfico de la citoarquitectura de la zona activa. Se muestra la relevancia del heterotrímero Rab3/RIM/Munc-13 en el anclaje de la VSs a la zona de liberación y el posicionamiento de canales de calcio sensibles a voltaje próximos a la VS mediado por RIM y RIM-BP, lo que permite crear microdominios de calcio. Adaptado de Südhof & Rizo 2011.

En este escenario molecular, en un primer paso, acontece la unión GTP-dependiente de Rab3 al heterodímero RIM/Munc-13, cuya finalidad es el anclaje de la VS a la zona activa. A continuación, la activación de Munc13 por  $\text{Ca}^{2+}$  y 1,2-diacilglicerol, aproxima aún más la VS a la región de la zona activa donde se va a fusionar. Finalmente, Munc-18 promueve la formación del complejo SNARE al permitir la entrada de sintaxina-1 en la superhélice del complejo (Sudhof 2012a) (fig 10).

# Introducción

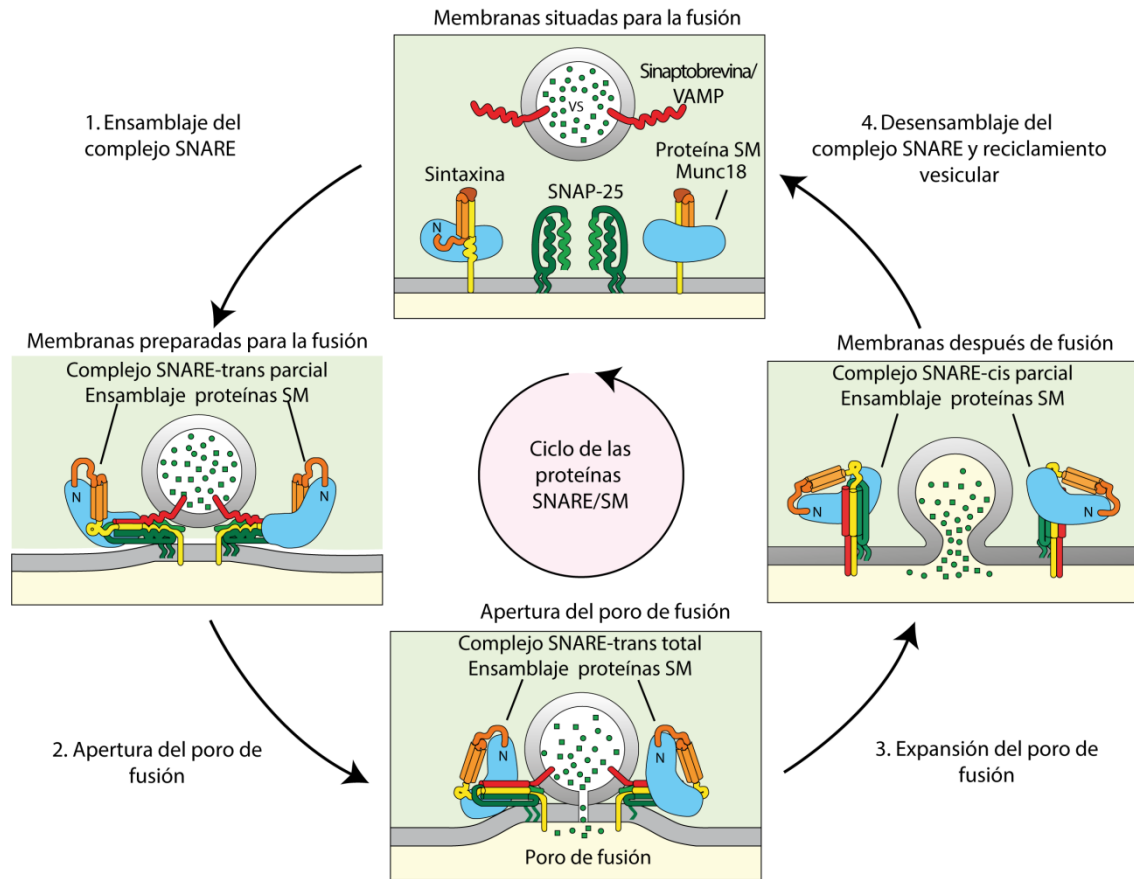


Figura 10: Esquema secuencial del ciclo de las proteínas SNARE/SM. Se muestran los primeros estadios de la aproximación de las membranas vesicular y plasmática, la formación del complejo SNARE en la conformación trans parcialmente ensamblado con la unión de las proteínas SM a través de sintaxina-1 (1). La formación de este complejo aproxima ambas membranas, permitiendo así la entrada de sinaptobrevina en el complejo SNARE y dando lugar a la conformación SNARE-trans total. En esta situación, y ante la entrada de  $Ca^{2+}$  se produce la apertura del poro de fusión (2). La expansión del poro de fusión da lugar a la conformación SNARE-cis (3) permitiendo la liberación del neurotransmisor. Finalmente el complejo SNARE se desensambla y la VS se recicla para una nueva ronda de exocitosis (4). Adaptado de Südhof & Rizo 2011.

## 2.2.3.1.2. Fusión calcio-dependiente de las vesículas sinápticas

La llegada de un potencial de acción y la fusión de las vesículas está íntimamente asociado al flujo de calcio en el interior del terminal sináptico, siendo el intervalo de tiempo transcurrido entre ambos fenómenos de 1-2 ms (Sabatini & Regehr 1996). El

## Introducción

sensor de calcio que acopla ambos fenómenos reside en la proteína vesicular sinaptotagmina, en cooperación con el cofactor citosólico complexina (Brose *et al.* 1992, Sudhof 2012a).

La proteína sinaptotagmina es una proteína transmembrana que alberga dos dominios citosólicos de unión de calcio, C2A (une 3 cationes  $\text{Ca}^{2+}$ ) y C2B (une 2 cationes  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Sudhof 2012a). Sinaptotagmina se une de forma dependiente de calcio a fosfolípidos ácidos (dominio C2A) y regiones de membrana ricas en fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ; (Jahn & Fasshauer 2012). En el caso particular de sinaptotagmina-1, los dominios C2 se unen también a sintaxina-1, interaccionando de esta forma con el complejo SNARE (Perin *et al.* 1991). Se han descrito 7 isoformas para dicha proteína, si bien syt-1 y syt-7 parecen ser, de forma redundante, las implicadas directamente en el proceso del priming (Bacaj *et al.* 2013).

A su vez, las complexinas también juegan un papel decisivo en el ensamblaje y evolución del complejo SNARE. Se ha descrito la acción activadora de complexina en el proceso de estabilización del complejo SNARE pre-ensamblado, un proceso que ha sido acuñado como "superpriming" (McMahon *et al.* 1995, Yang *et al.* 2010). En esta conformación de alta energía, la complexina actúa a modo de "freno", bloqueando la fusión vesicular espontánea hasta la entrada de calcio en el terminal (Yang *et al.* 2010, Jahn & Fasshauer 2012, Sudhof 2013, Wragg *et al.* 2013). En este escenario, sinaptotagmina y complexina interaccionan con el complejo SNARE previamente ensamblado y con regiones de membrana ricas en  $\text{PIP}_2$  (fig 11). La apertura de canales de calcio hace que 5 cationes  $\text{Ca}^{2+}$  se unan a los dominios citosólicos C2A y C2B de sinaptotagmina y ésta experimente un cambio conformacional, responsable de la salida de complexina del complejo SNARE y acercando aún más la VS a la zona activa (Sudhof 2013). Este acercamiento entre ambas membranas es posible gracias a los puentes catiónicos que establece el calcio entre los fosfolípidos de la membrana plasmática y los residuos de aspartato de los dominios C2 de sinaptotagmina (McMahon *et al.* 2010). Esto permite que la sinaptobrevina entre a formar parte del complejo SNARE completando, de este modo, el proceso de ensamblaje y provocando la apertura del poro de fusión (fig 11).

A la luz de estos hechos, resulta difícil resolver temporalmente el final del proceso de maduración funcional de la vesícula y el inicio de la fusión vesicular. Por esta razón, se considera como etapa limitante del proceso exocitótico la entrada de sinaptobrevina en el complejo SNARE, dado que si la distancia entre esta proteína y el complejo SNARE

# Introducción

ensamblado previamente es lo suficientemente pequeña tendrá lugar la fusión vesicular con la membrana plasmática (Jahn & Fasshauer 2012).

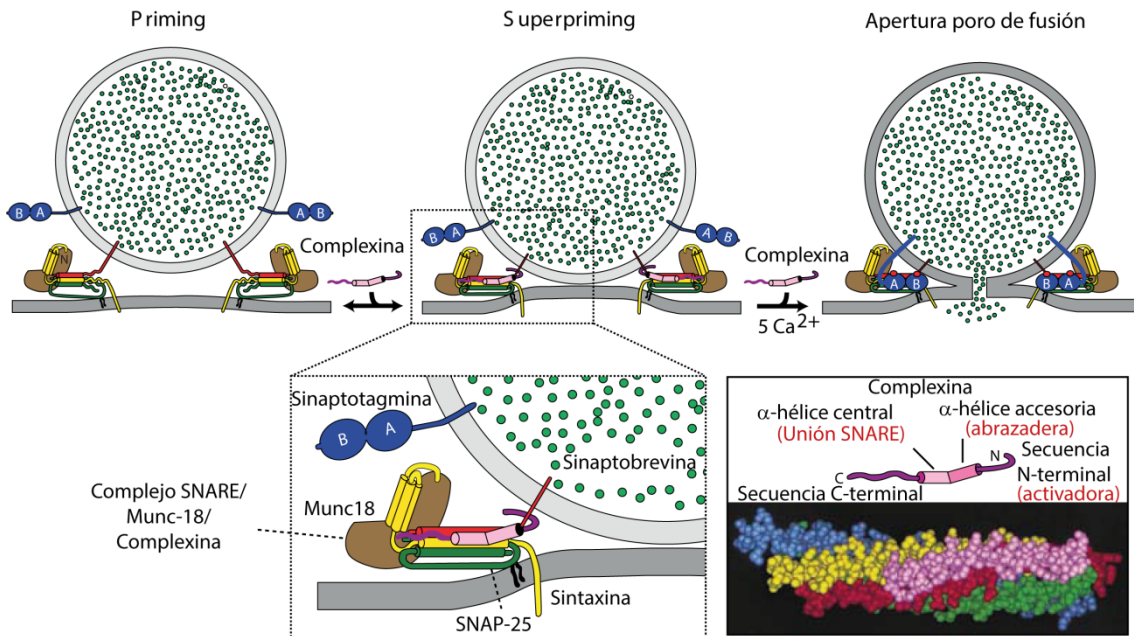


Figura 11: Esquema gráfico del mecanismo de acción de sinaptotagmina y complexina en la fusión vesicular dependiente de calcio. Se muestra el proceso de pre-ensamblaje del complejo SNARE ("priming") seguido de la entrada de complexina al complejo SNARE pre-ensamblado ("superpriming") y la apertura del poro de fusión tras la activación de sinaptotagmina con  $\text{Ca}^{2+}$  y la salida de complexina del complejo SNARE. Los paneles inferiores muestran una ampliación del complejo SNARE en la conformación "superprimed" (izquierda) y la estructura modular de la proteína complexina (derecha). Adaptado de Südhof 2012.

## 2.2.3.2. Endocitosis

El correcto funcionamiento del ciclo vesicular implica la capacidad de respuesta a estímulos eléctricos en lo que a frecuencia e intensidad de estimulación respecta. Este hecho hace necesario la existencia de mecanismos que garanticen la disponibilidad de vesículas con las que poder satisfacer dichas demandas. Por otro lado, parece evidente la necesidad de reciclar fragmentos de membrana a fin de evitar un deletéreo aumento de la superficie del terminal presináptico (Bittner & Kennedy 1970,

## Introducción

Kononenko & Haucke 2015). En los terminales, el principal mecanismo limitante en la disponibilidad de vesículas entre dos o más estímulos consecutivos es la endocitosis.

El concepto endocitosis hace alusión a la recuperación de fragmentos de membrana plasmática mediante invaginación y posterior fisión de ésta a fin de regenerar nuevas vesículas sinápticas, que serán posteriormente rellenas con neurotransmisor tras la reacidificación del lumen. Dada la dinámica del proceso, a esta secuencia de sucesos también se le ha designado clásicamente como "reciclamiento vesicular", en alusión a las múltiples vías de regeneración de vesículas descritas. Este concepto aparece por primera vez en la literatura en los años 70, cuando mediante el empleo de trazadores del ciclo vesicular y estudios de microscopía electrónica surgieron las primeras evidencias experimentales del proceso (Heuser & Reese 1973). Desde entonces, y hasta la actualidad, se han descrito 4 formas mayoritarias de endocitosis: endocitosis mediada por clatrina (Bloom *et al.* 1981, Heuser 1989, Granseth *et al.* 2007), endocitosis en masa (del inglés, *bulk endocytosis*; (Heuser & Reese 1973, Wu & Wu 2007, Clayton *et al.* 2008, Cousin 2015), la recientemente descrita endocitosis ultrarrápida (del inglés, *Ultrafast Endocytosis*; (Watanabe *et al.* 2013b, Watanabe *et al.* 2013a) y el mecanismo de reciclamiento local "Kiss and Run" (Alvarez de Toledo *et al.* 1993, Park *et al.* 2012). Aunque en este último caso no se puede de hablar de un mecanismo de endocitosis propiamente dicho, ya que la fusión de la VS con la membrana plasmática es solo parcial y no hay una segregación espacial ni temporal del evento exocitótico y endocitótico (Alabi & Tsien 2013) (fig 12).

El mecanismo de endocitosis acontecido depende de múltiples factores tales como la intensidad del estímulo exocitótico, el modelo neuronal o el estadio de maduración de las neuronas o de las sinapsis.

Los mecanismos de endocitosis mediada por clatrina, masiva y ultrarrápida serán descritos en mayor profundidad a continuación.

# Introducción

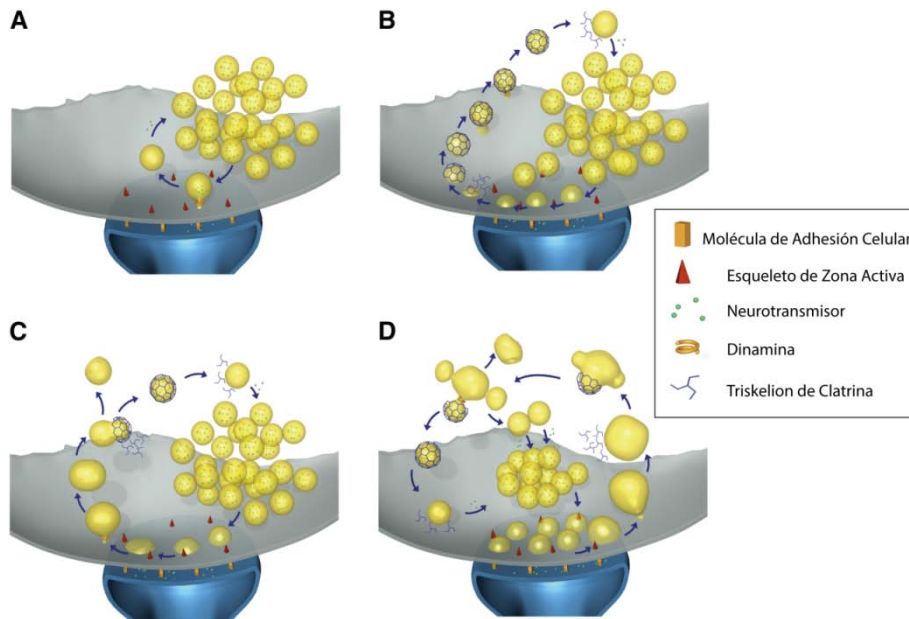


Figura 12: Esquema gráfico con los cuatro tipos de endocitosis descritos. A) "Kiss and Run"; B) Endocitosis mediada por clatrina; C) Endocitosis Ultrarrápida; D) Endocitosis en masa o tipo "bulk". Adaptado de Kononenko & Haucke 2015.

## 2.2.3.2.1. Endocitosis mediada por clatrina (EMC)

En esta modalidad de endocitosis, tras la fusión vesicular se genera una invaginación de membrana plasmática cubierta de clatrina en la zona adyacente a la zona activa, conocida como "zona periactiva", que termina por regenerar una nueva vesícula sináptica tras reacidificar su lumen y rellenarse con neurotransmisor. A lo largo de todo este proceso intervienen múltiples proteínas, que son reclutadas secuencialmente a la zona periactiva por proteínas adaptadoras (Saheki & De Camilli 2012), garantizando de este modo la fidelidad en el reciclamiento del proteoma vesicular (Takamori *et al.* 2006).

La EMC comienza con la unión de proteínas adaptadoras a regiones de membrana enriquecidas en  $PIP_2$ , lo cual genera una invaginación y favorece la unión de los triskeliones de clatrina a los dominios con  $PIP_2$  (Owen 2004). Esta invaginación recubierta por una malla de clatrina permanece unida a la membrana por un cuello citoplasmático, alrededor del cual, posteriormente, polimeriza la GTPasa dinamina y fisiona la vesícula regenerada. A continuación, la VS pierde la envuelta de clatrina

## Introducción

gracias a la actuación de la fosfatasa sinaptojanina, responsable de la eliminación del grupo fosfato (mediante hidrólisis) de la posición 5 del PIP<sub>2</sub>, eliminando de este modo los sitios de unión para las proteínas adaptadoras (Saheki & De Camilli 2012).

La envuelta de clatrina se une a la membrana gracias a la unión previa de las proteínas adaptadoras, responsables de la interacción tanto con regiones de membrana ricas en fosfoinosítidos como con los triskeliones de clatrina que conforman la malla de clatrina propiamente dicha. Entre las proteínas adaptadoras destaca el papel central del complejo adaptador AP-2, responsable de interactuar con dominios proteicos ricos en tirosina presentes en la proteína vesicular SV2 (Haucke & De Camilli 1999) y dominios proteicos ricos en dileucinas presentes en los transportadores de neurotransmisores (Fei *et al.* 2008, Shupliakov & Brodin 2010). Existen otras proteínas adaptadoras, adicionales a AP-2, específicas para la carga proteica a reciclar. Tal es el caso de AP-180, responsable del correcto reciclaje de sinaptobrevina al interactuar con esta a través del dominio SNARE (Miller *et al.* 2011, Gordon & Cousin 2013) o estonina-2, específica para el reciclaje de sinaptotagmina, en coordinación con AP-2 (Diril *et al.* 2006, Kononenko *et al.* 2013). AP-2 es un complejo heterotetramérico compuesto por 4 adaptinas, que interactúa tanto con regiones de membrana ricas en PIP<sub>2</sub> como con múltiples proteínas de la maquinaria endocítica. AP-2 recluta diversos factores encargados del reciclamiento específico de proteínas de la membrana vesicular, como son los adaptadores monoméricos estonina-2, AP-180 y las recientemente descritas iTRAPS (del inglés, *Intrinsic Trafficking Partners*; (Gordon *et al.* 2016, Gordon & Cousin 2016), así como los triskeliones de clatrina y las proteínas F-BAR. La acción coordinada de AP-2 con estonina-2, AP-180, iTRAPs, sinaptofisina y SV2A, posibilita la retención y reciclamiento específico de sinaptobrevina-2 y sinaptotagmina-1 en la zona periaxial (Gordon *et al.* 2016, Cousin 2017). De este modo, en la zona periaxial, se genera un módulo proteico que, en paralelo al inicio del proceso endocítico, garantiza el reciclamiento eficiente de las proteínas vesiculares imprescindibles para la competencia exocítica (Cousin 2017).

El ensamblaje de la malla de clatrina es un proceso cooperativo que aporta energía para el proceso endocítico. Además, se ha descrito la participación de múltiples "factores endocíticos", conocidos como proteínas F-BAR (del inglés, Bin-Amifisina-RV; en alusión al dominio común presente en todas ellas). Estas proteínas inician el proceso de endocitosis generando la curvatura de la membrana al interactuar con fosfolípidos de la membrana plasmática a través de su región amino terminal (Liu *et al.* 2015, Ford *et al.* 2002). Entre las múltiples proteínas que componen esta familia, cabe

## Introducción

destacar el papel de endofilina, que participa tanto en la curvatura de membrana como en la subsiguiente fisión y desmantelamiento de la malla de clatrina, debido a su interacción con dinamina-1 y -3 (Raimondi *et al.* 2011, Wu & Wu 2014) y sinaptojanina (Geng *et al.* 2016). El papel de muchos de estos factores es cooperativo e incluso redundante, ya que se ha observado la generación de VSs por endocitosis en ausencia de endofilina, aunque de forma menos eficiente, sugiriendo que otras proteínas pueden asumir las funciones de endofilina, como amfifisina (Itoh & De Camilli 2006). Dentro de esta familia de proteínas se encuentra también sindapina, caracterizada por poseer un dominio F-BAR ligeramente distinto y dar lugar a curvaturas de membrana más abiertas, clásicamente asociadas a fenómenos de endocitosis masiva o de tipo "bulk", con formación de endosomas (Clayton & Cousin 2009).

El ensamblaje de la malla de clatrina y la asistencia de los factores endocitóticos F-BAR generan una invaginación profunda de la membrana plasmática (fig 13), sin embargo, se hace necesaria la existencia de un mecanismo que fisione la VSs naciente de la membrana plasmática. En este proceso participan las proteínas dinamina-1 y dinamina-3, principales isoformas de esta proteína en el cerebro (Saheki & De Camilli 2012), y con funciones solapadas (Raimondi *et al.* 2011). Estas proteínas, pertenecientes a la familia de las GTPasas, oligomerizan alrededor del cuello de la VS naciente (Ferguson *et al.* 2007), haciendo que su activación por dimerización dependiente de la hidrólisis de GTP produzca un cambio conformación que estrangule el cuello de la VS provocando la fisión de la VS revestida de clatrina (Chappie *et al.* 2010, Ferguson & De Camilli 2012). Diferentes modelos sobre el mecanismo de acción de dinamina postulan que el proceso de dimerización tiene lugar entre anillos paralelos de la espira que se forma en el cuello, generando la hidrólisis del GTP el cambio conformacional responsable de la constricción del cuello de la VS (Chappie *et al.* 2011, Ford *et al.* 2011) (fig 8). Dinamina se recluta a la membrana plasmática por varias proteínas con dominios BAR, y actualmente numerosos estudios atribuyen un papel activo al citoesqueleto de actina, tanto en el reclutamiento de proteínas endocíticas a la membrana (Hussain *et al.* 2001, Schafer 2004, Grassart *et al.* 2014), como en su posible implicación en la generación de tensión mecánica que contribuya al proceso de fisión vesicular (Boulant *et al.* 2011, Rust & Maritzen 2015) (fig 13). Las proteínas encargadas de reclutar a dinamina, entre las que se encuentra endofilina, tienen dominios de interacción con la proteína fosfatasa de PIP<sub>2</sub>, sinaptojanina. El reclutamiento coordinado de endofilina junto con sinaptojanina, permite la hidrólisis del

## Introducción

grupo fosfato en la posición 5 de  $PIP_2$  (Cremona *et al.* 1999, Cremona & De Camilli 2001), eliminando los sitios de unión de la proteína adaptadora AP-2 y favoreciendo el desensamblaje de la cubierta de clatrina (Itoh & De Camilli 2006, Clayton *et al.* 2013). La acción coordinada de sinaptojanina junto con la ATPasa Hsc70 y su cofactor auxilina hacen del desmantelamiento del revestimiento de clatrina un proceso irreversible (Saheki & De Camilli 2012), dado que, por un lado, se eliminan los sitios de unión para AP-2, y por otro lado, auxilina se une a los fosfoinosítidos generados (PI(4)P), haciendo de esta sinergia un proceso termodinámicamente favorecido (Guan *et al.* 2010).

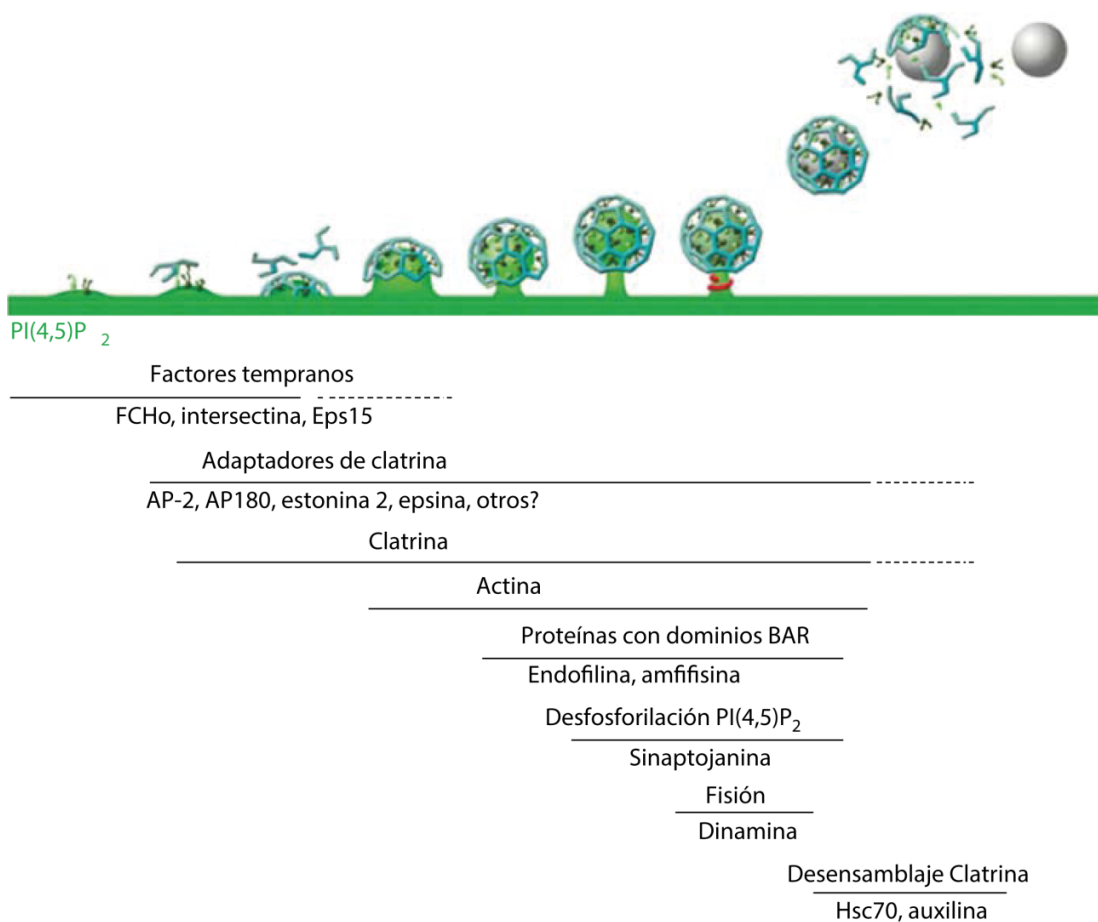


Figura 13: Esquema secuencial de reclutamiento y actuación de los distintos factores proteicos implicados en el proceso de EMC. Se ilustran los primeros estadios de reclutamiento de factores tempranos y unión de adaptadores de clatrina a dominios de membrana enriquecidos en  $PIP_2$  para generar curvatura de membrana y la malla de clatrina. Posteriormente se genera una invaginación con la vesícula naciente que es fisionada por la oligomerización y activación de la GTPasa dinamina. La VS generada pierde el revestimiento de clatrina cuando la fosfatasa

# Introducción

sinaptojanina hidroliza el PIP<sub>2</sub>, eliminando los sitios de unión para AP-2. La acción coordinada de ésta con la ATP-asa Hsc70 y su cofactor auxilina hacen que el desensamblaje de la malla de clatrina sea un proceso cooperativo. Adaptado de Sahekei & De Camilli 2012.

## 2.2.3.2.2. Endocitosis masiva (EM)

La endocitosis masiva (EM) o ADBE (del inglés, *activity-dependent bulk endocytosis*) es un mecanismo de recuperación de grandes fragmentos de membrana que acontece cuando un elevado número de VS se fusionan con la membrana plasmática en un corto intervalo de tiempo. Dicho incremento de membrana sería deletéreo para el terminal sináptico al aumentar la superficie de la zona activa y provocar su desestructuración (Clayton & Cousin 2009). El incremento de la superficie de membrana se recupera mediante la formación de grandes invaginaciones de membrana, que tras fisionarse de ésta dan lugar a vacuolas de tipo endosoma (Heuser & Reese 1973, Clayton *et al.* 2008). Por esta razón, este tipo de endocitosis ha sido propuesto como predominante en el sistema nervioso central ante estimulaciones de alta frecuencia (Cheung & Cousin 2013).

Trabajos previos han demostrado la naturaleza saturable de la endocitosis mediada por clatrina (Sankaranarayanan & Ryan 2000, Clayton & Cousin 2009), y una vez alcanzado dicho umbral se desencadena la endocitosis en masa (Clayton & Cousin 2009). Por esta razón, se ha postulado que la finalidad prioritaria de este tipo de endocitosis es la de mantener la homeostasis de la superficie de membrana con prioridad al reciclamiento vesicular sináptico inmediato (Clayton & Cousin 2009).

Respecto al devenir de los endosomas formados existe cierta controversia. Algunos autores sostienen que éstos rinden VS por gemación (Clayton *et al.* 2008, Clayton & Cousin 2009); otros, sin embargo, sugieren que dichas estructuras se acumulan sin generar nuevas vesículas en los tiempos de estudio considerados (Perez Bay *et al.* 2007, Bartolome-Martin *et al.* 2012). En lo que respecta a los mecanismos moleculares desencadenantes, la dinámica no es del todo conocida. El estímulo molecular iniciador de este tipo de endocitosis está regulado por un mecanismo de fosforilación/desfosforilación sobre la proteína dinamina-1, actuando de esta forma a modo de interruptor (Ferguson *et al.* 2007). Dinamina-1 pertenece a la familia de proteínas conocida como "Defosfinas", las cuáles se activan por la desfosforilación, dependiente de calcineurina, tras la elevación transitoria de la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el terminal

## Introducción

sináptico. El estado fosforilado/desfosforilado está controlado por la proteína quinasa GSK-3 y la calcineurina (Clayton *et al.* 2009, Clayton *et al.* 2010). Si bien la endocitosis en masa puede originar endosomas en ausencia de dinamina-1 (Ferguson *et al.* 2007), su papel parece decisivo para la gemación de VSs de los endosomas en cooperación con la proteína endocítica sindapina (Clayton *et al.* 2009) (fig 14A-B). Recientemente, se ha esclarecido la implicación de calcineurina, y por ende, de  $Ca^{2+}$ , en el reclutamiento y activación de dinamina-1 a los endosomas previamente internalizados (Cousin 2015). La gemación de VSs de los endosomas previamente internalizados tiene lugar como resultado de la acción coordinada de dinamina-1 y sindapina, activados por calcineurina y el calcio liberado de los endosomas (Cheung & Cousin 2013, Cousin 2015).

En el proceso de invaginación y constricción de los endosomas de la membrana plasmática, la dinámica del citoesqueleto de actina parece decisiva (Rust & Maritzen 2015, Wu *et al.* 2016). Se ha descrito la participación del citoesqueleto de actina tanto en el reclutamiento de las proteínas endocíticas y su interacción con dinamina-1 (Ferguson & De Camilli 2012), como en la actividad contráctil de las fibras de actomiosina que generan la tensión mecánica requerida para la fisión de los endosomas (Rust & Maritzen 2015, Li *et al.* 2016, Delvendahl *et al.* 2016, Wu *et al.* 2016, Soykan *et al.* 2017).

En el mecanismo de activación de dinamina-1, la calcineurina propicia la desfosforilación calcio-dependiente de los residuos de serina 774 y 778, deviniendo en un cambio conformacional (Clayton *et al.* 2009, Clayton *et al.* 2010). En esta configuración, calcineurina interacciona con sindapina, una proteína de la familia F-BAR que, gracias a este dominio, genera curvatura de la membrana plasmática y posibilita la internalización de grandes superficies de membrana (fig 14C). Finalizado el estímulo, y tras la inactivación de calcineurina, dinamina-1 es refosforilada secuencialmente: en primer lugar, Cdk5 fosforila el residuo Ser 778, y posteriormente, GSK fosforila la Ser 774, devolviendo a dinamina-1 a su estado inactivo (Clayton *et al.* 2010).

# Introducción

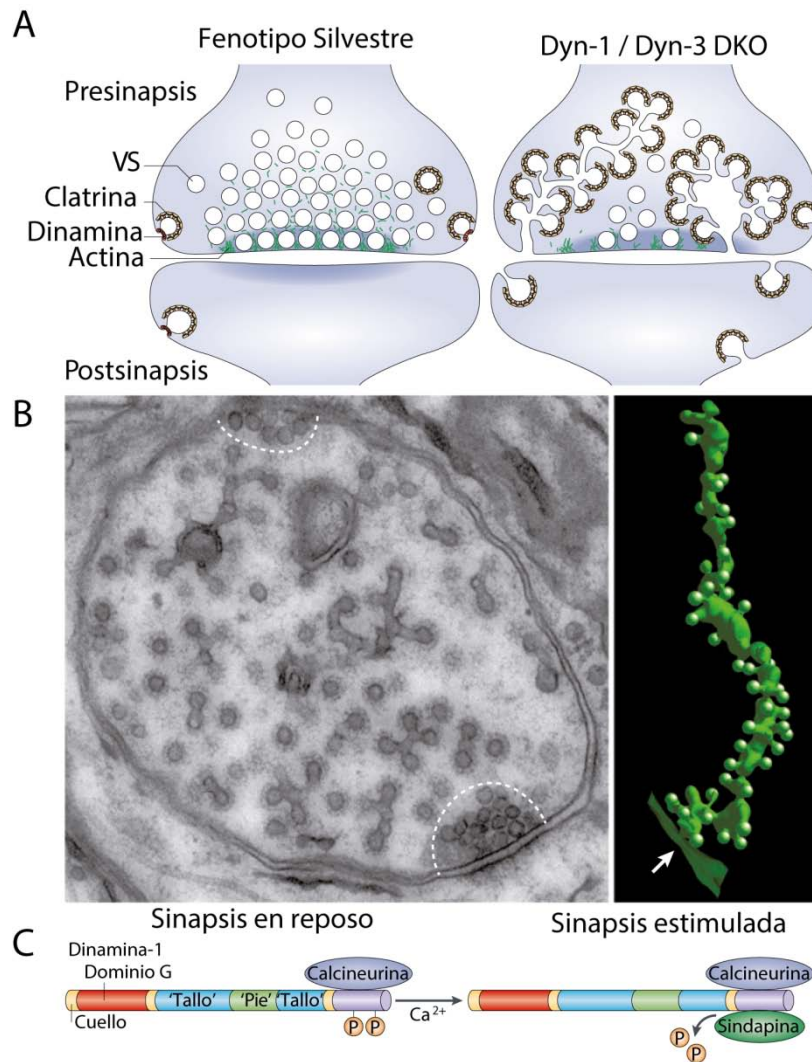


Figura 14: Participación de dinamina-1 y dinamina-3 en la endocitosis en masa. A) Esquema de un terminal sináptico de fenotipo silvestre (izquierda) y carente de dinamina-1 y 3 (derecha). Obsérvese la acumulación de estructuras tubulares y la ausencia de VSs. B) Izquierda: Micrografía de un terminal sináptico carente de dinamina-1. Se observan VSs y estructura tubulares de tipo endosoma. Derecha: Reconstrucción tomográfica de una zona activa de un terminal estimulado carente de dinamina-1 y 3 (Dyn-1/Dyn-3 DKO). Obsérvese la formación de una gran estructura tubular con múltiples protuberancias esféricas de tipo VS. C) Diagrama modular de dinamina-1 en situación de reposo y fosforilada (izquierda) y en su forma activada por Ca<sup>2+</sup>, sin los grupos fosfato y unida a sindapina. Adaptado de Ferguson & De Camilli. 2012.

Respecto a los complejos adaptadores que median en la gemación de vesículas de los compartimentos endosomales existen diferentes tesis al respecto. Se discute si en

## Introducción

este proceso de regeneración de vesículas median los complejos adaptadores AP-2, al igual que en la EMC (Kononenko *et al.* 2014), o si por el contrario son los complejos AP-3 y AP-1 los que cobran protagonismo en un proceso independiente de clatrina y sensible a brefeldina-A (Faundez *et al.* 1998, Voglmaier *et al.* 2006, Clayton *et al.* 2008, Clayton & Cousin 2009, Korber *et al.* 2012, Cheung & Cousin 2012, Ramperez *et al.* 2017) (fig 15). A pesar de la controversia existente en la literatura, algunos autores han atribuido la segregación en el uso de dichos complejos adaptadores a diferentes estadios de maduración sináptica, siendo los complejos AP-3 y AP-1 propios de estadios más inmaduros (Shetty *et al.* 2013) y clásicamente asociados a las extensas remodelaciones de membrana que tienen lugar en el cono axónico (Bonanomi *et al.* 2008). Sin embargo, recientemente esta hipótesis ha sido puesta en entredicho por algunos autores al considerar la endocitosis masiva como la prioritaria en neuronas del SNC (Park *et al.* 2016) y/o cuanto menos existente en todas las células del SNC (Nicholson-Fish *et al.* 2016). Algunos autores incluso atribuyen un papel determinante del complejo AP-1 en la formación de endosomas directamente desde la membrana plasmática (Perez Bay *et al.* 2007). Empíricamente, en el presente trabajo se ha constatado la participación de los complejo adaptadores AP-3 y AP-1 en el reciclamiento vesicular sináptico de neuronas granulares de cerebelo de rata sometidas a una estimulación intensa (Ramperez *et al.* 2017). No obstante, la inhibición farmacológica de dichos complejos con brefeldina-A no abole por completo el reciclamiento vesicular, lo que es compatible con la coexistencia de la vía de reciclaje AP-2- y clatrina-dependiente de VS a partir de los endosomas previamente formados (Kim & Ryan 2009, Kononenko *et al.* 2014).

Recientemente se ha descrito una especificidad de cargo mediante endocitosis masiva para las proteínas VAMP-4 (Nicholson-Fish *et al.* 2015) y syt-7 (Li *et al.* 2017). Ambas isoformas son distintivos moleculares en VSs de liberación asincrónica (Raingo *et al.* 2012, Bacaj *et al.* 2013, Evstratova *et al.* 2014), lo que sugiere el destino preferente para las vesículas regeneradas mediante este mecanismo.

# Introducción

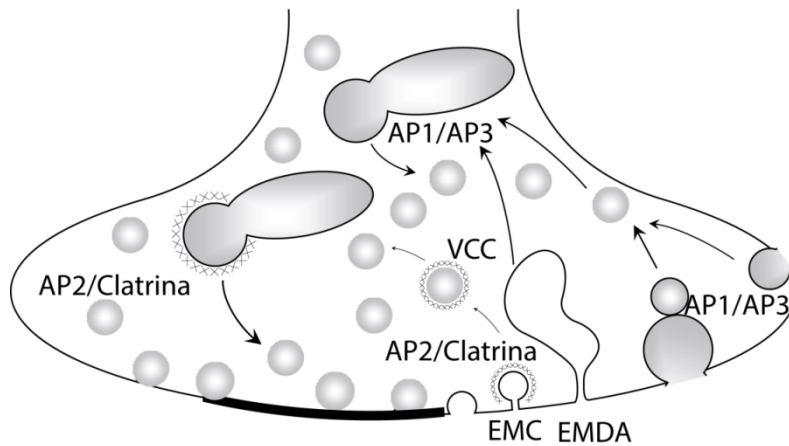


Figura 15: Esquema del reciclamiento vesicular sináptico en neuronas granulares de cerebelo de rata. Se muestran las dos vías mayoritarias de endocitosis en SNC: endocitosis mediada por clatrina (EMC), dependiente del complejo adaptador AP-2, con formación de vesículas cubiertas por clatrina (VCC) y endocitosis masiva (EM). Se ilustra la implicación de la vía de reciclamiento vesicular dependiente de AP1/AP-3 en la gemación de VS a partir de los endosomas formados en EM. Adaptado de Ramperez *et al.* 2017.

### 2.2.3.2.3. Endocitosis ultrarrápida

Este mecanismo de endocitosis se ha descrito en estudios realizados en *Caenorhabditis Elegans* y en neuronas de hipocampo. Para ello, se ha hecho uso de técnicas de optogenética y estimulaciones mínimas de 1 potencial de acción combinadas con análisis de ultraestructura con fijación de la muestra por congelación a altas presiones (Watanabe *et al.* 2013a, Watanabe *et al.* 2013b).

La internalización vesicular tiene lugar de forma inmediata al cese del estímulo que dispara la fusión vesicular, transcurriendo, en apenas, 50-100 ms después del estímulo. El reciclamiento vesicular cursa con invaginaciones de membrana de 80 nm aproximadamente de diámetro, que aparecen en las zonas adyacentes a la zona activa o zona periactiva (fig 16). De forma paralela, se ha constatado que las vesículas amarradas o ancladas a la zona activa ("docked vesicles") son el correlato estructural del subconjunto de VSs de liberación inmediata (RRP), un hecho que remarca la

## Introducción

eficiencia de reciclamiento vesicular que caracteriza a este mecanismo (Watanabe *et al.* 2013b, Watanabe *et al.* 2013a).

Si bien esta modalidad de endocitosis recuerda al reciclamiento local de VS mediante "Kiss and Run" en lo que a la escala temporal respecta, el tamaño de las vacuolas internalizadas es el equivalente a unas 4 VSs (fig 16), descartando por tanto dicha vía de endocitosis (Watanabe *et al.* 2013a).

Otra característica de la endocitosis ultrarrápida es que no requiere la participación de clatrina para la internalización de las vacuolas, si bien ésta si es requerida para la gemación de VSs de los endosomas previamente internalizados (Watanabe *et al.* 2014). Como en las formas de endocitosis previamente aludidas, la polimerización de actina alrededor del cuello de la invaginación de membrana es requerida para la fisión de la vacuola de la membrana plasmática (Watanabe *et al.* 2013b, Rust & Maritzen 2015), al igual que la acción de la GTPasa dinamina-2 (Watanabe *et al.* 2013b).

Aunque son muchos los aspectos aún desconocidos de este mecanismo de endocitosis, parece evidente la participación de proteínas F-BAR, tales como endofilina, en la generación de la curvatura de la membrana plasmática a fin de garantizar la velocidad del proceso (Kononenko *et al.* 2014).

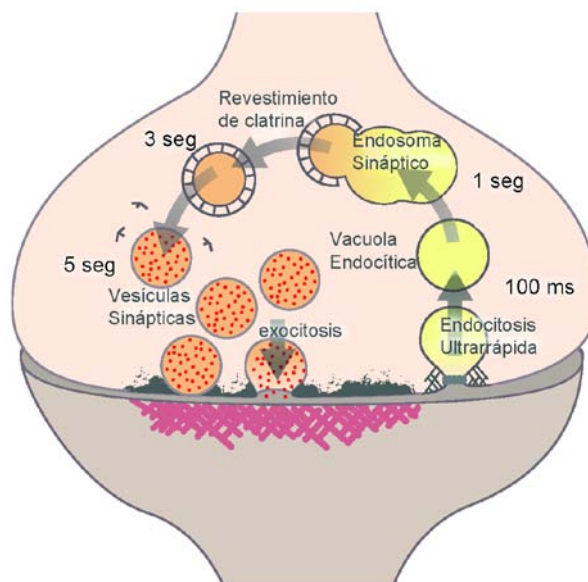


Figura 16: Esquema gráfico del reciclamiento vesicular mediante endocitosis ultrarrápida. Las VSs son recicladas desde la zona periaxial mediante la formación de estructuras vacuolares

## Introducción

en un intervalo de tiempo comprendido entre 50 y 100 ms. Éstas posteriormente se fusionan con endosomas de reciclaje preexistentes en el terminal. La gemación de las VSs de dichos endosomas tiene lugar mediante la vía AP-2 y clatrina dependiente que, tras acidificar su lumen y rellenarse con neurotransmisor, están disponibles para su liberación. Adaptado de Watanabe *et al.* 2014.

### **2.2.3.2.4. Modelo integrador de los mecanismos de endocitosis: Hipótesis del calcio**

El modelo de reciclamiento vesicular que parece emerger en este escenario es el de la coexistencia de múltiples mecanismos endocíticos activados bajo diferentes condiciones de estimulación. Así, estimulaciones mínimas de tan solo 1 potencial de acción activan preferentemente el reciclamiento local vesicular o "Kiss and Run" (Alvarez de Toledo *et al.* 1993, Park *et al.* 2012) o la recientemente descrita, endocitosis ultrarrápida (Watanabe *et al.* 2013a, Watanabe *et al.* 2013b, Watanabe *et al.* 2014), ambas formas caracterizadas por su extrema eficiencia en el reciclamiento vesicular. A su vez, estimulaciones de baja frecuencia propician la endocitosis mediada por clatrina y AP-2 (Takei *et al.* 1996, Shi *et al.* 1998, Granseth *et al.* 2006) mientras que estimulaciones intensas promueven la endocitosis en masa (Cheung & Cousin 2013, Cousin 2015, Cousin 2017) (fig 17). El estímulo que parece ser decisivo para desencadenar una u otra forma de endocitosis es la concentración de calcio alcanzada en el interior del terminal sináptico (fig 17). De este modo, una frecuencia de estimulación alta lleva asociada una entrada masiva de calcio en el terminal que desencadena la EM, mientras que frecuencias de estimulación moderadas dan lugar a una menor acumulación de calcio, siendo en este caso la EMC la vía de reciclamiento preferente (Kononenko & Haucke 2015).

# Introducción

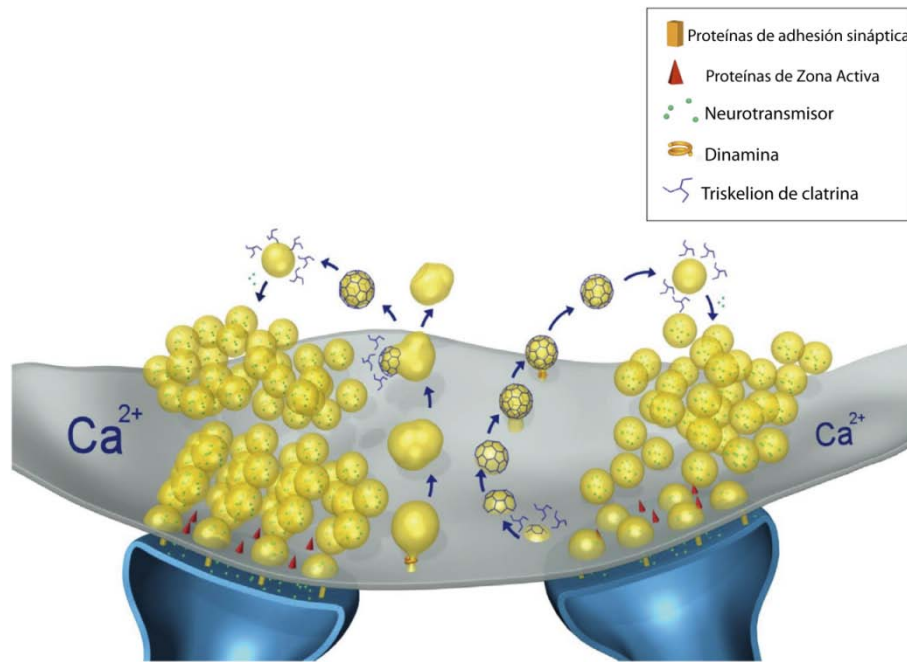


Figura 17: Modelo integrador para el reciclamiento vesicular sináptico en función de la concentración de calcio. Estimulaciones intensas promueven una entrada masiva de calcio en el terminal sináptico, desencadenando la EM (izquierda), mientras que frecuencias de estimulación moderadas o bajas dan lugar a menores concentraciones de calcio y favorecen la EMC (derecha). Adaptado de Kononenko & Haucke 2015.

Actualmente se discute si existe una segregación espacial en la membrana en lo que a estos dos últimos mecanismos de reciclamiento respecta. Estimulaciones de baja frecuencia promueven un reciclamiento vesicular mediante EMC, siendo de este modo posible el reciclamiento del aludido "Readily Retrievable Pool" en la región de la zona periactiva más próxima a la zona activa (Hua *et al.* 2011, Gimber *et al.* 2015). Por el contrario, estimulaciones más intensas dan lugar a un mayor volumen de VS fusionadas con la membrana plasmática, limitando la capacidad de reciclamiento mediante EMC (Sankaranarayanan & Ryan 2000, Clayton & Cousin 2009) y permitiendo la difusión de las proteínas vesiculares por la zona periactiva. En este escenario, las proteínas integrantes del "Readily Retrievable Pool" son internalizadas en grandes invaginaciones en los márgenes de la zona periactiva que darán lugar a los endosomas de la endocitosis masiva (Cousin 2017).

# Introducción

## 2.3. El citoesqueleto de actina

La actina es una proteína de pequeño tamaño (42 KDa), muy conservada en la evolución, de vital importancia para múltiples procesos de movilidad y remodelación celular, tráfico y transporte de orgánulos y vesículas, exocitosis y endocitosis. Constituye la proteína del citoesqueleto más abundante en los terminales sinápticos así como en las espinas dendríticas de las sinapsis excitatorias (Dillon & Goda 2005, Cingolani & Goda 2008, Rust & Maritzen 2015), siendo por ello de crucial importancia tanto a nivel estructural como funcional. En las siguientes secciones se detalla el papel del citoesqueleto de actina en las diferentes funciones presinápticas.

### 2.3.1. Dinámica del citoesqueleto de actina

En el citoplasma, la actina se encuentra en un equilibrio entre la forma monomérica globular (actina-G) y su estado polimerizado (actina-F), formando parte de los microfilamentos. Los monómeros de actina se unen entre sí formando inicialmente dímeros, y posteriormente éstos se anexionan a los microfilamentos de actina mediante uniones débiles no covalentes en forma dependiente de ATP, requiriéndose de la actividad ATPasa para la unión del dímero a los microfilamentos.

Los microfilamentos de actina poseen una marcada polaridad, distinguiéndose un extremo + o "desflechado" (*barbed end*) y un extremo - o "en punta de flecha" (*pointed end*). La dinámica de ensamblaje de actina, está regulado por la concentración de actina-G libre en el citoplasma, definiéndose una concentración crítica ( $C_c$ ) de actina-G para cada extremo por encima de la cual dicho extremo del filamento adiciona dímeros de actina-G y por debajo de la cual hay despolimerización neta. Esta  $C_c$  es notablemente menor en el extremo + ( $0,12 \mu\text{M}$ ) en comparación con el extremo - ( $0,60 \mu\text{M}$ ), lo que conduce en estado estacionario a un crecimiento neto en el extremo + y un acortamiento del filamento en el extremo -, sin modificarse por tanto la longitud neta del filamento (Chazeau & Giannone 2016).

Las vías de señalización encargadas de la remodelación del citoesqueleto de actina están orquestadas por la proteína GTPasa monomérica Rho A (del inglés, Ras Homology; (Rex *et al.* 2009, Momboisse *et al.* 2011, Ba *et al.* 2013) y su quinasa efectora ROCK (Gonzalez-Forero *et al.* 2012, Taoufiq *et al.* 2013). A nivel presináptico, se ha descrito la activación de Rho A por la proteína de adhesión celular N-Cadherina

## Introducción

(Bozdagi *et al.* 2000, Togashi *et al.* 2002), uniéndose al citoesqueleto de actina directamente a través de  $\alpha$ -catenina (Togashi *et al.* 2002), o de forma combinada junto con  $\beta$ -catenina (Murase *et al.* 2002, Bamji *et al.* 2003).

Sin embargo, la dinámica del citoesqueleto de actina está modulada a su vez por una vasta colección de proteínas accesorias, genéricamente designadas como ABP (del inglés, *Actin Binding Proteins*; (Dos Remedios *et al.* 2003, Winder 2003). Entre ellas, se encuentran proteínas estabilizadoras de los filamentos o proteínas de entrecruzamiento, como es Arp2/3, implicada en la ramificación de los filamentos de actina. Otras ABPs afectan a la estabilidad de los microfilamentos actuando a diversos niveles: a) uniéndose a los filamentos de actina y favoreciendo su despolimerización, como lo hacen gelsolina o ADF/cofilina (del inglés, *Actin Depolymerizing Factor*), b) secuestrando monómeros de actina-G, como es el caso de Profilina o c) uniéndose y bloqueando el extremo positivo (+), como es el caso de CapZ, o el extremo negativo (-) en el caso de tropomodulina.

Adicionalmente, se ha descrito la interacción de  $\alpha$ -sinucleína con actina-G como un mecanismo de regulación adicional de la dinámica del citoesqueleto de actina presináptico (Bellani *et al.* 2010). Esta interacción se establece entre dicha proteína y actina-G en condiciones de reposo, a concentraciones de calcio basales (~100 nM). La estimulación neuronal se traduce en un fuerte incremento de la concentración de calcio citosólico (hasta 100  $\mu$ M), lo que desencadena una disminución de la afinidad de  $\alpha$ -sinucleína por los monómeros de actina y por consiguiente su disociación de éstos. Este efecto depara en un incremento de la concentración efectiva de actina-G y por consiguiente en una polimerización neta de los microfilamentos (fig 18A), requeridos tanto para el proceso exocitótico y la translocación de VSs a la ZA (Morales *et al.* 2000, Richards *et al.* 2004, Wolf *et al.* 2015), como para la endocitosis y el reciclamiento vesicular (Shupliakov *et al.* 2002, Ho *et al.* 2011, Loebrich 2014, Wu *et al.* 2016) (fig 18B).

# Introducción

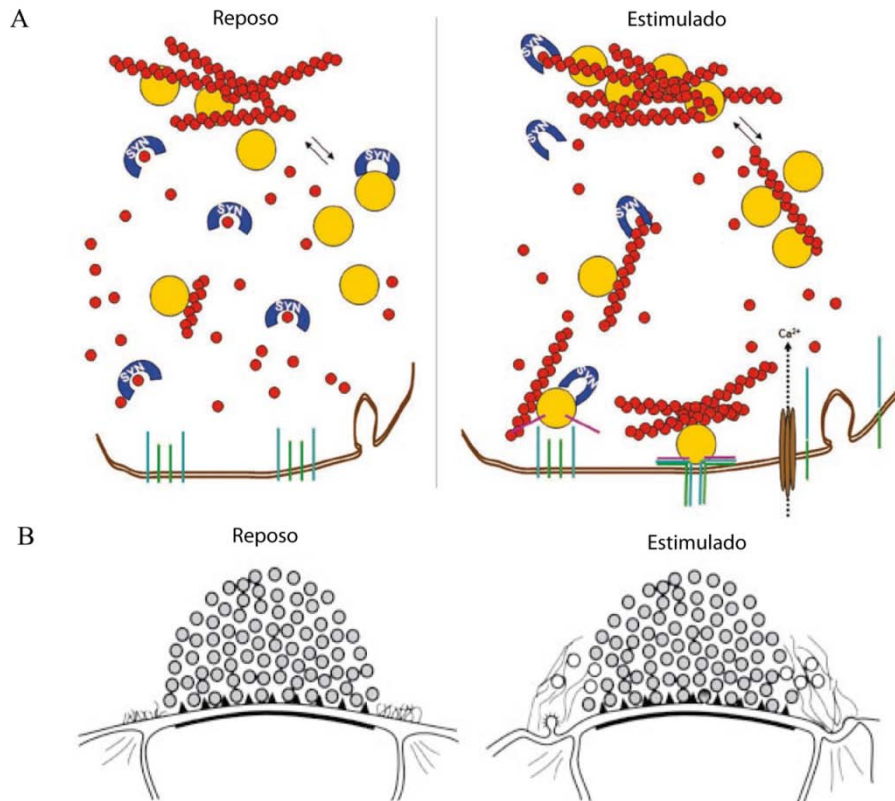


Figura 18: La estimulación neuronal promueve un incremento de la polimerización de actina presináptica. A) Modelo de polimerización de actina dependiente de actividad neuronal. En condiciones de reposo (izquierda), a una concentración de calcio basal (100 nM),  $\alpha$ -sinucleína secuestra los monómeros de actina y mantiene el equilibrio desplazado hacia la forma actina-G. Ante una estimulación (derecha), la concentración de calcio citosólico aumenta drásticamente (hasta 100  $\mu$ M), induciendo un cambio conformacional en  $\alpha$ -sinucleína y haciendo que ésta disminuya su afinidad por  $\alpha$ -sinucleína. Esto se traduce en un desplazamiento del equilibrio de actina hacia la forma polimerizada (F-actina). Adaptado de Bellani y cols., 2010. B) Esquema del conjunto vesicular en un terminal en reposo (izquierda) y estimulado (derecha). Apréciase la polimerización de microfilamentos en la zona periaxial como resultado de la estimulación. Adaptado de Shupliakov *et al.* 2002.

El mecanismo de acción de muchas ABPs es emulado por diversos fármacos, siendo una herramienta metodológica de gran utilidad para el estudio de la implicación del citoesqueleto de actina en múltiples procesos celulares. A este respecto, se han aislado distintas toxinas de esponjas marinas, hongos y bacterias que afectan a la dinámica de los filamentos de actina. En el presente trabajo, se han utilizado dos

## Introducción

fármacos procedentes de esponjas marinas con efecto antagónico sobre el citoesqueleto de actina: Jasplakinolida (aislado de *Jaspis johnstoni*), se une a los filamentos de actina estabilizándolos, y Latrunculina-A (aislado de *Latrunculia magnifica*), agente secuestrador de monómeros de actina-G que desplaza el equilibrio de actina hacia la forma G.

Numerosos trabajos en la literatura científica consensuan la importancia de la plasticidad en la remodelación del citoesqueleto de actina, más allá del estado neto de polimerización de los microfilamentos en lo que respecta a la regulación del ciclo vesicular (Wolf *et al.* 2015, Wen *et al.* 2016) y procesos de plasticidad sináptica (Sankaranarayanan *et al.* 2003, Boulant *et al.* 2011, Chazeau & Giannone 2016, Hernandez *et al.* 2016).

### 2.3.2. Función de la actina presináptica

La presencia y funcionalidad de la actina presináptica ha sido un aspecto de intenso debate (Allison *et al.* 2000, Zhang & Benson 2001). Si bien su presencia en los terminales sinápticos ha sido ampliamente acreditada (Morales *et al.* 2000, Dillon & Goda 2005, Rust & Maritzen 2015), su función en los diferentes procesos sinápticos sigue generando cierta controversia. En las secciones siguientes se detalla la implicación del citoesqueleto de actina en los diferentes procesos sinápticos.

#### 2.3.2.1 Función de la actina en el mantenimiento de la integridad presináptica

La citoarquitectura de los terminales sinápticos está mantenida por una red de actina subyacente a la membrana plasmática, conocido como "actina cortical" (Sankaranarayanan *et al.* 2003), siendo dicho citoesqueleto uno de los principales componentes estructurales de la citomatriz (Bleckert *et al.* 2012).

Se ha propuesto que la actina cortical pudiera actuar a modo de "barrera física" para el proceso de exocitosis (Cingolani & Goda 2008), resultando por tanto su desmantelamiento en una mayor fusión vesicular (Morales *et al.* 2000, Meng *et al.* 2002). Sin embargo, esta hipótesis ha sido puesta en entredicho recientemente, en diferentes modelos neuronales, al considerarse imprescindible la capacidad de remodelación del citoesqueleto de actina para el proceso exocitótico (Zimmermann *et*

## Introducción

*al.* 2015, Wolf *et al.* 2015), y máxime por el papel activo que ésta juega en el reclutamiento de VSs al RRP (Rust & Maritzen 2015).

Aunque no se conoce con exactitud si esta red de actina cortical juega un papel estrictamente estructural, o si por el contrario participa activamente en los diferentes procesos sinápticos (Doussau & Augustine 2000), se ha descrito que Piccolo gobierna el proceso de ensamblaje de actina en la zona activa (Wang *et al.* 1999, Wagh *et al.* 2015, Gundelfinger *et al.* 2015) y la exocitosis vía profilina-2 (Waites *et al.* 2011). Así mismo, es crucial el papel señalizador de N-Cadherina en el proceso de reestructuración del citoesqueleto de actina mediado por la vía  $\alpha$ - $\beta$ -catenina/Rho A/ROCK que, en última instancia, condiciona el establecimiento de sinapsis maduras estables (Antonova *et al.* 2001, Zhang & Benson 2001, Bonhoeffer & Yuste 2002).

### **2.3.2.2. Papel del citoesqueleto de actina en el mantenimiento de los diferentes pools de VSs y el intercambio de vesículas entre ellos**

El citoesqueleto de actina juega un importante papel en el abastecimiento de VSs al RRP a expensas del RtP y RP (Kuromi & Kidokoro 1998, Sakaba & Neher 2003), siendo de crucial importancia en sinapsis de gran tamaño con una clara segregación espacial de los pools de VSs (Owe *et al.* 2009). De este modo, las VSs son movilizadas a la zona activa en forma dependiente de los filamentos de actina, sinapsina y la proteína motora miosina (Morales *et al.* 2000, Sakaba & Neher 2003, Hayashida *et al.* 2015), llegando incluso a intervenir en los procesos de anclaje o "docking" de las VSs a la zona activa (Bellani *et al.* 2010).

Por otra parte, se discute sobre el potencial papel regulador de la envuelta de actina que mantiene la segregación espacial entre RRP y los pools de reserva y reciclamiento (Shupliakov *et al.* 2002, Richards *et al.* 2004, Cingolani & Goda 2008). Clásicamente, se ha establecido que el papel de dicha envuelta es la de aglutinar dichas vesículas dentro de los pools impidiendo así su dispersión (Sankaranarayanan *et al.* 2003), y mantenerlas unidas mediante su unión con sinapsina (Greengard *et al.* 1994, Evergren *et al.* 2007). Sin embargo, dicha hipótesis se ha puesto en entredicho recientemente, al constatarse que el desmantelamiento de la envuelta de actina por sí mismo no induce la dispersión vesicular (Sankaranarayanan *et al.* 2003), a diferencia de la ausencia de las diferentes isoformas de sinapsina (Benfenati *et al.* 1989a,

# Introducción

Akbergenova & Bykhovskaia 2010, Fornasiero *et al.* 2012, Verstegen *et al.* 2014) y otros conectores vesiculares que mantienen la integridad del pool de reserva (fig 19B).

Mediante técnicas de microscopía electrónica combinadas con inmunomarcaje con partículas de oro se ha puesto de manifiesto la presencia de filamentos de actina en los márgenes del pool de reserva y su exclusión en el interior del cluster vesicular (fig 19A; (Bloom *et al.* 2003, Evergren *et al.* 2004). Esta distribución de la actina es consistente con el papel que juegan dichos filamentos en la translocación de VSs entre la zona activa y los pools de reserva y reciclamiento (Rust & Maritzen 2015) y la unión de VSs con los microfilamentos de actina en combinación con sinapsina (Benfenati *et al.* 1989b, Benfenati *et al.* 1989a, Greengard *et al.* 1994, Chi *et al.* 2003, Akbergenova & Bykhovskaia 2010, Shupliakov *et al.* 2011).

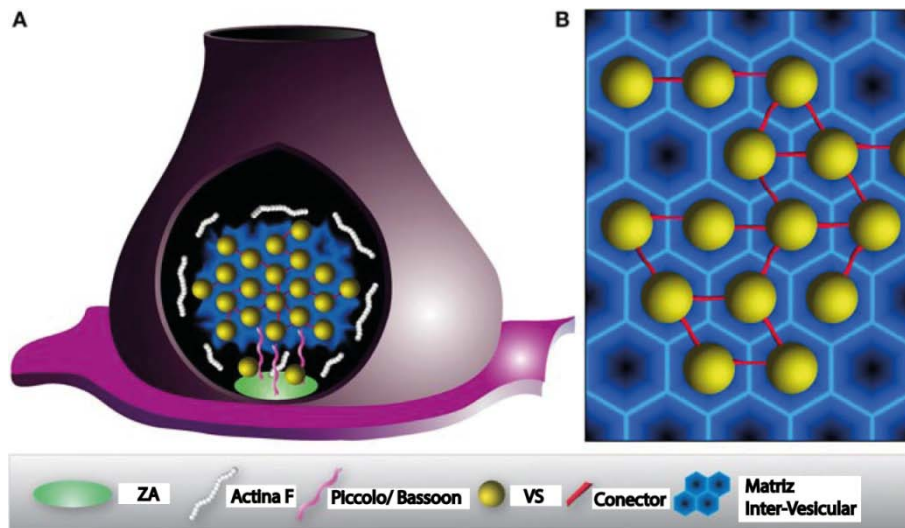


Figura 19: A) Modelo gráfico de la distribución topológica del cluster de VSs y la citomatriz de un terminal presináptico. B) Detalle ampliado del cluster de VSs entrelazadas mediante conectores y dispuestas en rejillas hexagonales. Adaptado de Pechstein & Shupliakov 2012.

### 2.3.2.3. Función de la actina en la regulación del ciclo vesicular sináptico

Una de las principales funciones del citoesqueleto de actina presináptico es su participación en las diferentes etapas del ciclo vesicular (Dillon & Goda 2005, Cingolani & Goda 2008). A este respecto, el citoesqueleto de actina parece influir en todas las

## Introducción

etapas del ciclo vesicular sináptico (Doussau & Augustine 2000). Sin embargo, su influencia depende del tipo de sinapsis (Morales *et al.* 2000), su estadio de desarrollo (Zhang & Benson 2001) y/o su historial de actividad previa.

### 2.3.2.3.1. Función del citoesqueleto de actina durante la exocitosis

La dinámica del citoesqueleto de actina es un factor indispensable en el proceso exocitótico (Cingolani & Goda 2008, Rust & Maritzen 2015). Los microfilamentos de actina se encuentran presentes en la zona activa (Hirokawa 1989, Phillips *et al.* 2001) junto con moléculas de adhesión sináptica que se unen al citoesqueleto de actina (Uchida *et al.* 1996, Phillips *et al.* 2001, Sudhof 2000), sugiriendo una participación activa de los mismos en la exocitosis.

En primera instancia, los filamentos de actina proporcionan el soporte para la movilización vesicular hacia la zona activa (Wolf *et al.* 2015) y el abastecimiento del RRP bajo estímulos de gran intensidad (Wang *et al.* 1996, Cole *et al.* 2000, Kuromi & Kidokoro 1998, Sakaba & Neher 2003, Lee *et al.* 2015).

Estudios anteriores sugerían que el citoesqueleto de actina cortical actuaba a modo de "barrera física" para el proceso exocitótico (Morales *et al.* 2000, Meng *et al.* 2002) (fig 20B). Sin embargo, recientemente esta hipótesis se ha cuestionado en distintos modelos neuronales por diversas razones. En primer lugar, los filamentos de actina son responsables del posicionamiento preferente del RP adyacente a la zona activa en sinapsis pequeñas (Marra *et al.* 2012). Por otra parte, la dinámica de los microfilamentos proporcionan la tensión mecánica para el proceso fusogénico de las VSs con la membrana plasmática (Wen *et al.* 2016) (fig 20A).

### 2.3.2.3.2. Función del citoesqueleto de actina en el reciclamiento vesicular

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto la importancia de la dinámica del citoesqueleto de actina en el proceso de reciclamiento vesicular, tanto en modelos neuronales (Shupliakov *et al.* 2002, Sudhof 2004, Bleckert *et al.* 2012, Wu *et al.* 2016) como en células neurosecretoras (Miklavc *et al.* 2015).

Por una parte, se ha descrito que la actina, junto con el colesterol, participa en el confinamiento de las proteínas vesiculares en la zona periaxial de la membrana

## Introducción

plasmática durante la endocitosis, resultando su despolimerización en un marcado defecto endocitótico (Dason *et al.* 2014). A su vez, el citoesqueleto de actina, junto con la proteína motora miosina, participa activamente en los diferentes mecanismos de endocitosis generando la tensión mecánica necesaria durante el proceso de invaginación vesicular y reclutamiento de la maquinaria endocitótica (Wu *et al.* 2016, Soykan *et al.* 2017) (fig 20C). De este modo, se ha puesto de manifiesto su implicación en la EMC (Loebrich 2014, Grassart *et al.* 2014, Chandrasekar *et al.* 2014), en la endocitosis masiva, tanto en la maduración de los endosomas formados durante la endocitosis (Nguyen *et al.* 2012) como en la fisión de éstos de la membrana plasmática (Gormal *et al.* 2015, Kokotos & Low 2015), y en la endocitosis ultrarrápida (Watanabe *et al.* 2013b).

Con independencia del mecanismo de endocitosis acontecido, la interacción de los microfilamentos y/o proteínas de unión a actina con diferentes elementos de la maquinaria endocitótica son decisivos en la coordinación de este proceso. En este escenario, el calcio es determinante en la promoción de la polimerización de actina dependiente de actividad en la zona periaxial (Shupliakov *et al.* 2002, Pechstein & Shupliakov 2010), actuando para ello de forma concertada a múltiples niveles. Por un lado, la entrada de calcio en los terminales promueve la polimerización de actina al desplazar la unión de sus monómeros de la  $\alpha$ -sinucleína (Bellani *et al.* 2010) fig 18A). Por otra parte, recientemente, se ha descrito en neuronas corticales la implicación del activador del plasminógeno tisular en el reclutamiento, dependiente de calcineurina, de profilina II a la zona periaxial (Yepes *et al.* 2016), promoviendo, dicha proteína, la polimerización de actina en dicha región.

## Introducción

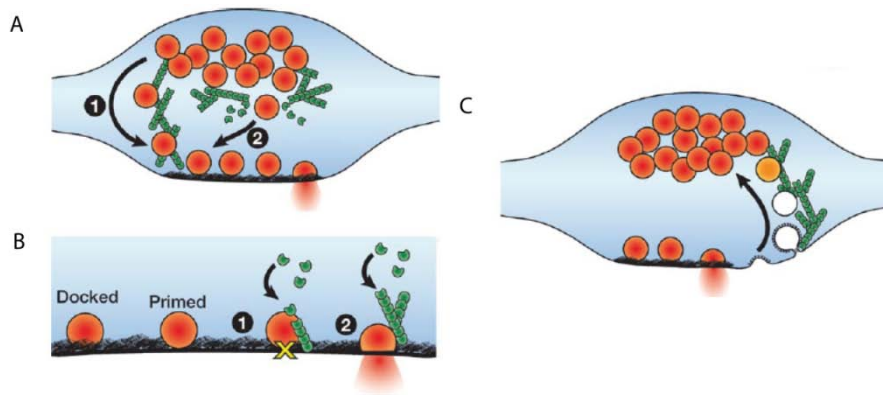


Figura 20: Participación del citoesqueleto de actina en el ciclo vesicular. A) Modelos de actuación del citoesqueleto de actina en la movilización de VSs desde el pool de reserva hacia la zona activa. Modelo 1: los filamentos de actina junto con la proteína motora miosina transportan las VSs hacia la zona activa. Modelo 2: los filamentos de actina conforman una barrera física entre RP y RRP que limita la exocitosis. B) Modelos de actuación de la actina en la liberación de neurotransmisor. Modelo 1: la actina ejerce un papel a modo de "freno" en la última fase de ensamblaje de la maquinaria exocitótica. Modelo 2: la actina juega un papel facilitador en el reclutamiento y ensamblaje de la maquinaria exocitótica. C) Papel facilitador de los filamentos de actina durante el proceso de endocitosis. La polimerización de actina dependiente de actividad en la zona periaxial asiste al proceso de internalización vesicular y reingreso de las VSs en el pool de reserva. Adaptado de Dillon & Goda 2005.

### 2.4. Modelo de Sinapsis Defectuosa: Síndrome del cromosoma X Frágil

El síndrome del X frágil (SXF) es un trastorno monogénico hereditario ligado al cromosoma X que constituye la principal causa de discapacidad intelectual heredada, y la segunda causa de autismo por detrás del autismo idiopático (Santoro *et al.* 2012). Las manifestaciones clínicas más frecuentes son hiperactividad, deficiencias en el comportamiento social, repetición de patrones de comportamiento estereotipados, episodios epilépticos y discapacidad intelectual (Hagerman *et al.* 2009, Dolan *et al.* 2013, Huber *et al.* 2015). A éstas, se les añaden una serie de características fisonómicas tales como macro-orquidismo, cara elongada y/o orejas de gran tamaño (Santoro *et al.* 2012) que, en su conjunto, conforman el cuadro clínico de dicho síndrome.

## Introducción

### 2.4.1. Ultraestructura y señalización celular en células corticales Fmr1 KO

La característica morfológica más reseñable de dicho síndrome es el aumento generalizado de la densidad de espinas dendríticas delgadas hipofuncionales tipo "dedo" en detrimento de las funcionales o de tipo "champiñón" en hipocampo y neuronas corticales (Bagni & Greenough 2005, Dolan *et al.* 2013), un fenotipo clásicamente ligado a la inmadurez sináptica (Irwin *et al.* 2000, Nimchinsky *et al.* 2001, Klemmer *et al.* 2011) (fig 21A).

A nivel ultraestructural, los terminales presinápticos Fmr1 KO de neuronas de hipocampo y corteza muestran un claro aumento del número de vesículas amarradas a la zona activa o "docked" en contraposición al genotipo silvestre (WT, del inglés "Wild Type"; (Klemmer *et al.* 2011) (fig 21B). Esta disposición vesicular constituye un correlato estructural al fenómeno constatado de un mayor tamaño del RRP (Rosenmund & Stevens 1996, Schikorski & Stevens 2001). Por otra parte, estudios recientes han reportado alteraciones en el número de VSs por unidad de superficie sináptica (densidad de VSs) en diferentes modelos celulares, si bien la tendencia de dicho parámetro no parece ser uniforme en todos ellos. En sinapsis CA3-CA1 de hipocampo, la densidad de VSs se encuentra ligeramente disminuida con respecto al genotipo silvestre (Klemmer *et al.* 2011), mientras que este mismo parámetro no se ve afectado en células de Purkinje de cerebelo (Broek *et al.* 2016). Empíricamente, en neuronas corticales de ratón, tanto en cultivo como en rodaja, dicho parámetro muestra mayor densidad de VSs en el genotipo Fmr1 KO con respecto al genotipo silvestre. En este escenario, resulta lógico plantearse si dichas fluctuaciones están motivadas por diferencias en el tamaño de área sináptica considerada.

A nivel genético, este trastorno tiene su origen en el silenciamiento del gen Fmr1, motivado por la hipermetilación de las repeticiones en tándem del triplete CGC en la región 5' no codificante del gen (Verkerk *et al.* 1991). Dicho efecto tiene como resultado el silenciamiento de la expresión de la proteína FMRP, cuya función es ejercer como represor local de la síntesis de una gran cantidad de proteínas sinápticas (Verkerk *et al.* 1991, Nelson *et al.* 2013). FMRP se une a los ARNm de las proteínas diana reprimiendo su traducción (Darnell & Klann 2013), siendo, en última instancia, responsable de las múltiples manifestaciones clínicas y comportamentales aludidas anteriormente.

## Introducción

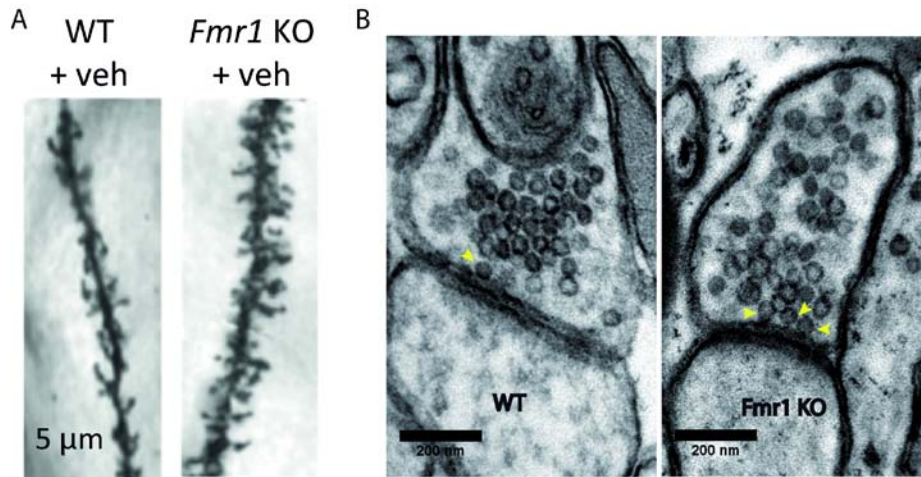


Figura 21: Alteraciones morfológicas en las espinas dendríticas y terminales presinápticos de neuronas corticales de ratón. A) Espinas dendríticas de neuronas piramidales de la capa II/III de corteza de ratón WT (izquierda) y *Fmr1* KO (derecha). Nótese el aumento de la densidad de espinas dendríticas en *Fmr1* KO. Adaptado de Dolan *et al.* 2013. B) Sinapsis de neuronas piramidales de capa II/III de corteza de ratón WT (izquierda) y *Fmr1* KO (derecha). Obsérvese la morfología estrecha y elongada de las sinapsis *Fmr1* KO en contraposición a las WT, así como el aumento de la fracción de vesículas "docked" en aposición con la membrana plasmática en dicho genotipo.

La carencia funcional de FMRP ocasiona un fuerte aumento de la traducción de una vasta colección de proteínas pre- y postsinápticas, alterando numerosas vías de señalización y dando lugar a importantes alteraciones morfológicas y de plasticidad sináptica (Kelleher & Bear 2008, Hoeffler & Klann 2010, Annangudi *et al.* 2010, Auerbach *et al.* 2011, Klemmer *et al.* 2011). Por esta razón, animales carentes del gen *fmr1* (*Fmr1* KO) constituyen un excelente modelo para el estudio de dicho síndrome.

En relación con la síntesis de proteínas incrementada, se ha descrito la desregulación del complejo de señalización mTOR en modelos animales de autismo (Huber *et al.* 2015), que, a su vez, se traduce en alteraciones funcionales de diversas rutas de señalización celular. La desregulación funcional del complejo mTOR se origina por una excesiva señalización glutamatérgica mediada por receptores metabotrópicos de glutamato de tipo I (mGluR1/5), un aspecto característico de dicho síndrome (Pop *et al.* 2014). Inicialmente, en el año 2004, Bear y colaboradores denominaron como "la teoría de los mGluR" al conjunto de síntomas que componen el síndrome del X Frágil

## Introducción

ligados al exceso de señalización a través de dichos receptores (Bear *et al.* 2004). La activación de los receptores metabotrópicos de glutamato de tipo I está acoplada a la señalización por  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_i$ , conduciendo ambas rutas a la LTD característica de estos pacientes. Esta vía de señalización es responsable de la LTD en amígdala (Suvrathan *et al.* 2010) e hipocampo (Huber *et al.* 2015, Connor *et al.* 2011, Stoppel *et al.* 2017). En dicha región, se ha demostrado la acción terapéutica de la restitución de los niveles de AMPc, mediante la inhibición farmacológica de la fosfodiesterasa-4 (PDE-4) con "Rolipram", sobre el déficit de memoria del que adolecen dichos pacientes (Choi *et al.* 2015). Además, en relación con la señalización mediada por mGluR5, se han descrito alteraciones en la LTD mediada por el sistema endocanabinoide en la post-sinapsis de neuronas glutamatérgicas. La ausencia de FMRP previene el acoplamiento entre la señalización mediada por mGluR5 y la enzima diacilglicerol lipasa- $\alpha$  (DGL- $\alpha$ ), responsable de la generación de 2-araquidonilglicerol (Jung *et al.* 2012). Recientemente, en hipocampo de ratones *Fmr1* KO, se ha descrito la acción terapéutica ejercida por el agonista inverso del receptor de endocannabinoides 1 (CB1R) "Rimonabant" al prevenir la LTD característica de dicho genotipo (Gomis-Gonzalez *et al.* 2016).

A su vez, se ha identificado un déficit enzimático en la enzima diacilglicerol quinasa  $\zeta$  (DGK  $\zeta$ ), responsable de un desequilibrio en la proporción 1,2-di-acilglicerol/ácido fosfatídico, capaz de reproducir *per se* las manifestaciones propias de SXF en ratón (Tabet *et al.* 2016) (fig 22). En las espinas dendríticas, el ácido fosfatídico actúa como un estabilizador de los filamentos de actina a través de múltiples efectores, entre los que se encuentran el complejo mTORC1, Rac1, PAK1 y PI5K (Tabet *et al.* 2016), un proceso fisiológico de crítica importancia en la plasticidad sináptica y consolidación de la memoria (Buffington *et al.* 2014).

# Introducción

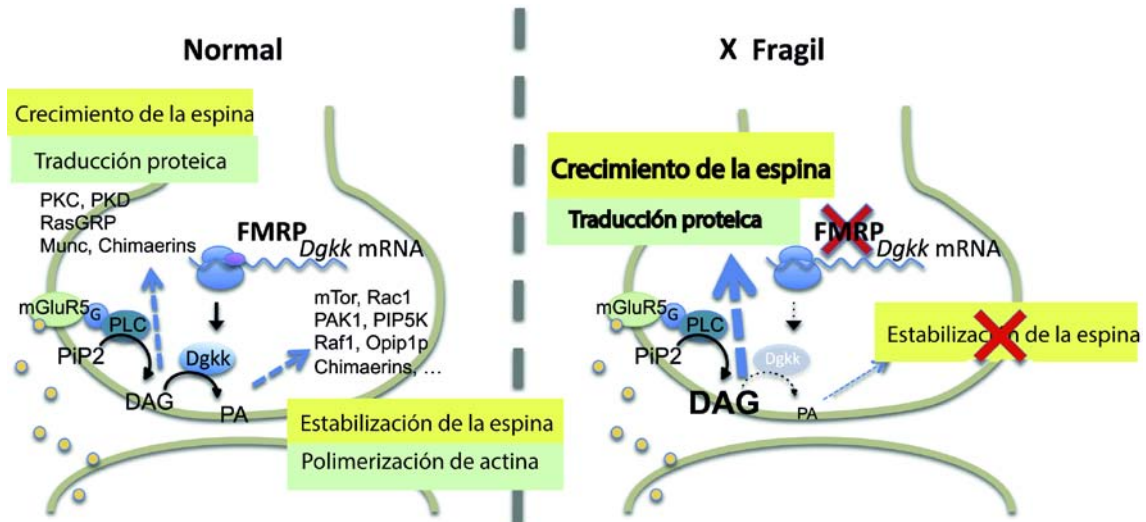


Figura 22: Modelo de estabilización de las espinas dendríticas dependiente de FMRP: En presencia de FMRP (izquierda), la activación de mGluR5 lleva a la activación de PLC a través de la proteína Gq, quien genera 1,2-DAG que es metabolizado a AP a través de Dgkk responsable de la estabilización de las espinas dendríticas a través de los efectores mTORC1, Rac1, PAK1, PI5K y PKCz. En ausencia de FMRP (derecha), el 1,2-DAG se acumula en ausencia de DGK  $\zeta$ , dando lugar a un incremento local de la traducción de proteínas sinápticas. Adaptado de Tabet *et al.* 2016.

## 2.4.2. Dinámica del citoesqueleto de actina en células corticales Fmr1 KO

Numerosos trabajos han constatado una disfunción en las vías conducentes a la polimerización de actina reguladas por el complejo mTORC2 (Chen *et al.* 2010, Dolan *et al.* 2013, Nolze *et al.* 2013, Huber *et al.* 2015, Michaelsen-Preusse *et al.* 2016, Michaelsen-Preusse *et al.* 2018), un aspecto de destacada importancia en la homeostasis estructural de las espinas dendríticas, y presumiblemente también en el ciclo vesicular presináptico. Estas alteraciones tienen su origen en un efecto dual, ya que por una parte FMRP interacciona con diversas proteínas reorganizadoras del citoesqueleto de actina y por otra parte modula la expresión de muchas de ellas (Maurin *et al.* 2014).

En este escenario, la vía de señalización Rho A/ROCK conducente a la remodelación del citoesqueleto de actina se presenta como una de las más afectadas (Kubo *et al.* 2008). El nexo molecular entre FMRP y la mencionada vía es complejo y parcialmente

## Introducción

desconocido. Sin embargo, algunas de las alteraciones del citoesqueleto de actina parecen residir en los factores citosólicos CYFIP1/2 (del inglés, *CYtoplasmatic FMRP Interacting Protein 1/2*) (Schenck *et al.* 2001), encargados de promover la nucleación de la polimerización de actina mediante la transducción de la señalización por las proteínas G pequeñas Rho A y Rac1 (Pyronneau *et al.* 2017), que activan a Arp2/3 (del inglés, *Actin Related Proteins 2/3*; proteínas nucleadoras de la polimerización de actina; (Cory & Ridley 2002, Derivery & Gautreau 2010). En particular, se ha descrito que las neuronas de hipocampo carentes de FMR1 presentan una deficiencia en la proteína OPHN1 (Oligophrenin-1), un factor con actividad GAP de Rho A. Esta proteína se localiza en zonas endocíticas donde regula, a la baja, la actividad de la vía Rho A/ROCK, reprimiendo la función inhibitoria de ROCK sobre la endocitosis (Maurin *et al.* 2014). En este sentido, se ha constatado que los ratones carentes de OPHN1 presentan deficiencias en el proceso de neurotransmisión que pueden ser revertidos mediante la administración del fármaco inhibidor de ROCK Y-27632 al restablecer la EMC (Khelifaoui *et al.* 2009).

### **2.4.3. Relación entre la morfología sináptica y la dinámica del citoesqueleto de actina presináptico**

En este contexto, se hace evidente la existencia de un nexo molecular entre la ultraestructura sináptica y la dinámica del citoesqueleto de actina presináptica. Esta conexión reside, al menos en parte, en la pareja de moléculas de adhesión celular neurexina (NRX), presináptica y neuroligina (NLG), postsináptica, una unión crucial en el establecimiento de sinapsis maduras funcionales (Varoqueaux *et al.* 2006) y cuya desestabilización se encuentra fuertemente asociada al autismo (Foldy *et al.* 2013). Recientemente, en *Drosophila melanogaster*, se ha descrito la interconexión existente entre la señalización sináptica mediada por neurexina y la reorganización del citoesqueleto de actina presináptico (Rui *et al.* 2017). El par NRX-NLG induce la polimerización de actina presináptica al activar a Rac-GTP mediante su factor intercambiador de nucleótidos de guanina, Pix, una interacción proteína-proteína que se establece entre los dominios PDZ de neurexina y Scribble (fig 23), actuando éste último como puente entre neurexina y Pix (Rui *et al.* 2017).

## Introducción

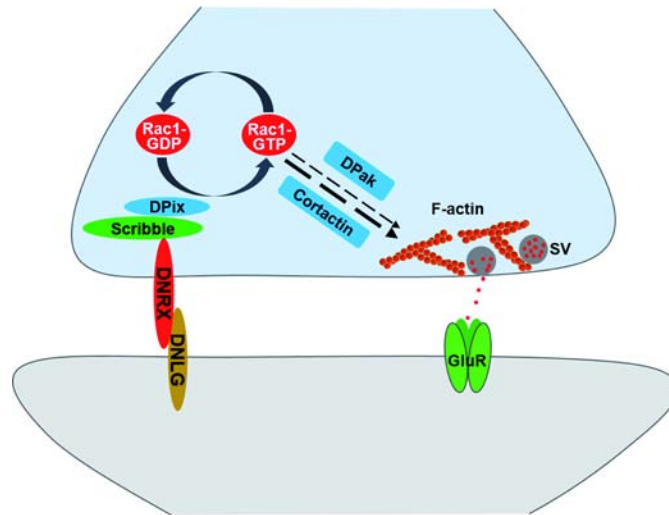


Figura 23: Modelo de regulación de la agregación y liberación de VSs en *Drosophila melanogaster* mediado por la F-actina presináptica, modulado por la señalización neurexina-Scribble-Pix conducente a la activación de Rac1. Extraído de Rui *et al.* 2017.



## **III-Objetivos**

---

"El propósito de la vida es contribuir de alguna manera a hacer las cosas mejor"

Robert F. Kennedy



# Objetivos

## III-OBJETIVOS

El ciclo vesicular sináptico es un proceso complejo y finamente regulado en el cual múltiples mecanismos de endocitosis operan bajo determinados estímulos, coordinando así exocitosis y reciclamiento vesicular. En trabajos previos del grupo se había puesto de manifiesto que en los terminales sinápticos de neuronas granulares de cerebelo coexisten diferentes mecanismos de endocitosis, cuya contribución al reciclamiento vesicular depende de la intensidad del estímulo y del grado de madurez de la sinapsis. Por otra parte, también se demostró la presencia de estructuras endosomales en algunos terminales sinápticos cuyo incremento correlacionaba con un reciclamiento vesicular más ineficiente. La participación de los complejos adaptadores AP-1/AP-3 parece ser determinante tanto en la fisión de endosomas de la membrana plasmática como en su posible transformación posterior en vesículas sinápticas, fundamentalmente en sinapsis inmaduras. Por otra parte, la dinámica del citoesqueleto de actina juega un papel crucial en la mayoría de las etapas del ciclo vesicular. Múltiples trabajos evidencian la implicación de la actina en procesos de exocitosis, diferentes mecanismos de endocitosis, reorganización y translocación vesicular dentro de los terminales sinápticos e incluso compartición de VSs entre botones sinápticos adyacentes en fibras axónicas. También, en este caso, se atribuye la mayor dependencia de la dinámica del citoesqueleto de actina a una menor madurez sináptica. En este complejo escenario, nos propusimos analizar si estos mecanismos contribuyen de manera diferencial a la regulación del ciclo vesicular en los botones sinápticos, que presentan diferente eficiencia de reciclamiento, en dos modelos de estudio: (1) neuronas granulares de cerebelo de rata y (2) neuronas corticales de ratón, tanto de genotipo silvestre (WT) como en un modelo de sinapsis defectuosa (Fmr1 KO). Los objetivos específicos planteados en este trabajo fueron los siguientes:

### 3.1. Neuronas granulares de cerebelo de rata

3.1.1. Analizar de forma comparativa el efecto de la estimulación química con KCl 50 mM y diferentes protocolos de estimulación eléctrica sobre el reciclamiento vesicular, para establecer las condiciones experimentales que conducen a la movilización de todas las vesículas del "pool" de reciclamiento.

## Objetivos

3.1.2. Estudiar la implicación de los complejos adaptadores AP-1/AP-3 en el reciclamiento vesicular, en las poblaciones de botones de reciclamiento eficiente e ineficiente, mediante diferentes técnicas de imagen en célula viva y microscopía electrónica.

3.1.3. Evaluar, mediante inmunocitoquímica, imagen en célula viva y microscopía electrónica, la contribución del citoesqueleto de actina en el reciclamiento vesicular, utilizando abordajes farmacológicos que afectan a la dinámica del mismo, en las poblaciones de botones que muestran distinta eficiencia de reciclamiento.

### 3.2. Neuronas corticales de cerebro de ratón

3.1.1. Estudiar, mediante técnicas de imagen en célula viva y microscopía electrónica el reciclamiento vesicular en los genotipos WT y Fmr1 KO, y el efecto de la disrupción farmacológica de la dinámica del citoesqueleto de actina en el mismo.

3.2.2. Analizar la ultraestructura de las sinapsis de neuronas WT y Fmr1KO en cultivos sometidos a diferentes protocolos de estimulación, prestando especial atención al número y disposición de las vesículas con respecto a la zona activa.

3.2.3. Cuantificar mediante técnicas de imagen en célula viva el tamaño del subconjunto de VS de inmediata liberación (RRP) en neuronas WT y Fmr1 KO.

3.2.4. Caracterizar, mediante microscopía electrónica de secciones corticales de cerebro, la ultraestructura de las sinapsis establecidas por las neuronas piramidales de la capa II/III de cerebro. Analizando:

- la densidad de contactos sinápticos asimétricos en WT y Fmr1 KO
- el número y distribución espacial de las VSs en los terminales de neuronas piramidales de ambos genotipos, en condición de reposo y tras una estimulación eléctrica.

## IV-Materiales & Métodos

---

*"Eso desean quienes viven estos tiempos, pero no les toca a ellos decidir. Sólo tú puedes decidir qué hacer con el tiempo que se te ha dado"*

Gandalf, El Señor de los Anillos



## IV-MATERIALES & MÉTODOS

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Material Biológico

Para el desarrollo experimental de este trabajo se emplearon dos tipos de cultivos celulares pertenecientes a dos modelos animales diferentes.

Para la realización de los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata se emplearon ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar de 7 días de edad, proporcionadas por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Los animales se mantuvieron en todo momento con la madre hasta una hora antes de su sacrificio.

Para la realización de los cultivos de neuronas corticales de cerebro se emplearon ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6 tanto de genotipo silvestre (en adelante "WT", en alusión al acrónimo inglés "Wild Type"), como de genotipo Fmr1 KO (ratón carente del gen Fmr1, modelo animal para el estudio del síndrome del X-Frágil). Estos ratones se adquirieron de Jackson Laboratory y, posteriormente, se establecieron y se han mantenido las colonias en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Todo el procedimiento experimental llevado cabo en este trabajo, tanto el manejo como el sacrificio de los animales, se realizó de acuerdo con las directrices éticas para la experimentación con animales y la normativa establecida por la Comisión Europea (86/609/CEE) y el Parlamento Europeo (2010/63/UE), que posteriormente fueron aprobadas por el comité ético de la UCM.

#### 4.1.2. Material de cultivo

El kit de digestión enzimática con papaína (*Papain Dissociation System*) se adquirió de Worthington (NJ, EE.UU.; nº cat: LK003160).

Para la elaboración del medio de cultivo se empleó Neurobasal A (nº cat: 10888-022), el suplemento del medio de cultivo B-27 50x (nº cat: 17504044) y la fuente de

## Materiales y Métodos

Glutamina de liberación lenta "Glutamax 100x" (nº cat: 35050038). Todo ello se compró a Invitrogen, Life Technologies (CA, EE.UU.).

De Sigma-Aldrich se adquirieron los siguientes reactivos: citosina  $\beta$ -D-arabinofuranósido, un análogo de nucleósido inhibidor de la replicación del DNA (nº cat: C1768), solución antibiótica-antimicótica 100x (nº cat: A5955), EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*; nº cat: E6265), poli-L-lisina para el tratamiento de las diferentes superficies para el cultivo (nº cat: P4707).

En la realización de los cultivos se empleó un agitador orbital WY-100 de COMECTA (Barcelona, España), un incubador HERA Cell de Thermo Fischer Scientific (NC, EE.UU.) y una cabina de flujo laminar PV-30 de Telstar (Terrasa, España).

En aquellos casos en los que fue necesario transfectar las células se empleó el equipo Amaxa Nucleofector II de Amaxa Biosystems (Colonia, Alemania) y el kit para la electroporación de neuronas de rata, Rat Neuron Nucleofector Kit, de Lonza (nº cat: VPG-1003; Basilea, Suiza).

### 4.1.3. Equipos

#### 4.1.3.1. Adquisición de imágenes: microscopios y cámaras

Para la adquisición de imágenes en experimentos de célula viva e inmunocitofluorescencia se empleó un microscopio de epifluorescencia de la marca Nikon (Japón), modelo Eclipse TE-2000S equipado con un objetivo de inmersión en aceite Nikon CFI plan Apo VC 60x con apertura numérica de 1.4 y una cámara CCD modelo iXON<sup>EM</sup>+DU885 de Andor Technology (Belfast, Irlanda).

Para los experimentos de imagen en célula viva, se utilizó una cámara de perfusión de flujo laminar de intercambio rápido RC-20 (volumen 36  $\mu$ l, Warner Instruments; CT EE.UU.) montada sobre un soporte PH5. Para aquellos estudios en los que fue requerida la estimulación eléctrica con estimulador de campo, se empleó la cámara RC-21BRF2 (volumen 263  $\mu$ l, Warner Instruments). Dicha cámara está conectada a un sistema de perfusión VC6 (Warner Instruments) operando a una velocidad de flujo constante de 1ml/min. Todo el sistema de perfusión está termostatizado a 37°C empleando para ello un sistema de control de temperatura TC-344B (Warner Instruments).

## **Materiales y Métodos**

Los fluoróforos usados fueron excitados con un monocromador de Kinetic Imaging (Nottingham, Reino Unido) empleando para ello luz monocromática de la longitud de onda específica.

En los estudios de ultraestructura en secciones coronales de corteza cerebral de ratón, para la localización y correcto posicionamiento del electrodo de estimulación en la capa V o de neuronas piramidales grandes, se empleó un microscopio FN1 ECLIPSE (Nikon).

En los análisis ultraestructurales de microscopía electrónica se utilizó un microscopio JEOL JEM 1010 (Tokyo, Japón) del Centro Nacional de Microscopía Electrónica.

### **4.1.3.2. Detección y cuantificación de proteínas**

En la electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior transferencia de las proteínas a membranas de PVDC (Life Sciences, BIO-RAD, Madrid, España; nº cat: 1620174) se empleó el dispositivo Mini-Protean® Tetra Cell de Bio-Rad (CA, EE.UU.). Para la ulterior detección y cuantificación de proteínas se empleó el sistema Odyssey de Li-Cor Biosciences (NE, EE.UU.).

### **4.1.3.3. Estimulación eléctrica**

Para la estimulación eléctrica de neuronas granulares de cerebelo de rata se empleó un estimulador de campo CS-20 (CIBERTEC).

Para la estimulación de neuronas piramidales de cerebro de ratón se emplearon electrodos bipolares THETA de borosilicato (BT-150-10) con un estimulador eléctrico S48 GRASS (W. WARWICK, RI, U.S.A.) acoplado a una unidad de aislamiento ISU 165 (CIBERTEC).

### **4.1.3.4. Obtención de secciones coronales de corteza de ratón**

Para la obtención de secciones coronales de corteza de ratón se empleó un vibratomo VT 1200S de Leica Microsystems (Wetzlar, Alemania).

# Materiales y Métodos

## 4.1.4. Reactivos y fármacos

### 4.1.4.1. Microscopía Electrónica de Transmisión

De Sigma Aldrich (Mo, EE.UU) se obtuvieron glutaraldehído 25% (nº cat: G6257) y paraformaldehído sólido (nº cat: 1581127) empleados en la fijación de las células, solución de peróxido de hidrógeno 30% (nº cat: 95321) y peroxidasa de rábano tipo VI-a (nº cat: P6782) empleadas para el marcaje de endosomas y tabletas de 3,3'-diaminobencidina SIGMAFAST (nº cat: D4168) empleadas para la fotoconversión de orgánulos de reciclamiento.

De Electron Microscopy Sciences (PA, EE.UU) se adquirió el tetróxido de osmio al 2% empleado en la post-fijación celular ( $\text{OsO}_4$ ; nº cat:19170).

De TAAB (Berkshire, Reino Unido) se adquirió el kit de resina "SPURR low viscosity" empleado para la inclusión de las muestras (nº cat: S024D).

Merck suministró el etanol empleado en las deshidrataciones de las muestras (nº cat: 1070174000) y ferrocianuro potásico ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ); nº cat: 104971).

De Invitrogen Life Technologies se obtuvo la sonda  $\text{FM}^{\text{TM}}1\text{-}43_{\text{FX}}$  (nº cat: F35355), un análogo fijable de FM1-43 empleado como trazador vesicular.

### 4.1.4.2. Experimentos de imagen en célula viva

#### 4.1.4.2.1. Sales

Todas las sales empleadas en la elaboración de medios tamponados se han adquirido de Merck-Milipore.

#### 4.1.4.2.2. Sondas fluorescentes

La sonda fluorescente FM1-43 utilizada como marcador del ciclo vesicular sináptico se adquirió de Invitrogen Life Technologies (CA, EE.UU; nº cat: T35356). Se trata de una sonda de naturaleza anfipática, que se intercala en las membranas vesiculares tras un ciclo de exo-endocitosis y emite fluorescencia en entornos hidrofóbicos cuando se excita con luz de 479 nm de longitud de onda.

## Materiales y Métodos

### 4.1.4.2.3. Fármacos

Los datos referentes a los fármacos empleados en este trabajo se recogen en la siguiente tabla (tabla 1).

Tabla 1: Relación de fármacos empleados, indicándose su diana o efecto, casa comercial y su número CAS.			
FÁRMACO	DIANA Y EFECTO	CASA COMERCIAL	Nº CAS
Brefeldina A	Inhibidor del GEF de ARF-1	bioorbyt	20350-15-6
Jasplakinolida (JSK)	Estabilizador de los filamentos de actina	Sigma Aldrich	102396-24-7
Latrunculina A (LA)	Agente despolimerizador de actina	Sigma Aldrich	76343-93-6
Bafilomicina A1	Inhibidor de la V-ATPasa vesicular	Abcam	88899-55-2

### 4.1.4.2.4. Extracción y detección de proteínas

Para la extracción de las proteínas totales se utilizó el tampón de lisis RIPA (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 0,5 EGTA, 1% Triton X-100 (v/v), 0,1% desoxicolato sódico (v/v), 0,1% dodecil sulfato sódico (v/v), 140 mM NaCl; nº cat: 11834141) junto con el kit de inhibidores de proteasas y fosfatasa (nº cat: 10085973) de Thermo-Fischer (NC, EE.UU.).

Para el desarrollo de la electroforesis en geles de poliacrilamida se adquirieron los siguientes compuestos, todos ellos de Bio-Rad (CA, EE.UU.): solución de acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 al 40% (nº cat: 161-0148), dodecil sulfato sódico (SDS; nº cat: 161-0301), tetrametiletilendiamina (TEMED; nº cat: 1610800), persulfato

## Materiales y Métodos

amónico (nº cat: 161-0700), membranas de nitrocelulosa (nº cat: 162-0115),  $\beta$ -mercaptoetanol (nº cat: 161-0710), glicina (nº cat: 161-0718), patrones de peso molecular comerciales de 10-250 KDa (nº cat:161-0373) y reactivo de Bradford empleado en la cuantificación de proteínas (nº cat: 500-0205). La solución de bloqueo empleada fue Odyssey blocking Buffer, de Li-Cor Bioscience (NE, EE.UU; nº cat: 927-40000).

### 4.1.4.3. Técnicas de Inmucitofluorescencia

Los datos referentes a los anticuerpos primarios, sueros y anticuerpos secundarios empleados se recogen en las tablas 2, 3 y 4 respectivamente.

Tabla 2: Relación de anticuerpos primarios utilizados en inmunocitoquímica y western-blot. Se especifica el antígeno, especie y dilución empleada.				
DIANA	ESPECIE	DILUCIÓN	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
AP-2(adaptina $\alpha$ )	Ratón	1:2000	AB_397867	BDBIOSCIENCES
AP-3 ( $\beta$ 2)	Conejo	1:2000	AB_477556	Sigma-Aldrich
Dominio luminal syt1	Conejo	1:100	AB_10694095	Synaptic Systems
Bassoon	Conejo de indias	1:500	AB_2290619	Synaptic Systems
Actina	Conejo	1:500	AB_10708070	Cytoskeleton

## Materiales y Métodos

**Tabla 3: Relación de sueros empleados en inmunocitofluorescencia y dilución empleada.**

SUERO	ESPECIE	DILUCIÓN
Suero normal de cabra	Cabra	10%

**Tabla 4: Relación de anticuerpos secundarios empleados. Se especifica la especie donde se han producido, la especie diana, dilución empleada y referencia.**

DIANA	MARCAJE	ESPECIE	DILUCIÓN	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
IgG de Ratón	IRDye 680	Cabra	1:5000	AB_621840	LI-COR BIOSCIENCES
IgG de Conejo	IRDye 800	Cabra	1:5000	AB_621843	LI-COR BIOSCIENCES
IgG de Conejo	IRDye 800	Cabra	1:15000	AB_10796098	LI-COR BIOSCIENCES
IgG de Conejo Indias	Alexa 594	Cabra	1:250	AB_2534120	Thermo Fischer Scientific

### 4.1.5. Portaobjetos y cubreobjetos

Los cubreobjetos de vidrio de 15 mm de diámetro (nº cat: CB00150RA1), los cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro (nº cat: CB00250RA003) y los portaobjetos de vidrio de 26x76 mm (nº cat: AD00000112E) los suministró Mentzel-Gläser (Braunschweig, Alemania).

# Materiales y Métodos

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Cultivo de neuronas granulares y corticales: modelos de estudio de la sinapsis glutamatérgica

Como primer modelo de estudio de la sinapsis glutamatérgica se utilizó el cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo de rata. Para ello, se utilizaron ratas albinas Wistar (*Rattus norvegicus*) de 7 días postnatales.

Posteriormente, y para los estudios en los que fue requerido, se realizaron cultivos de neuronas corticales de cerebro de ratón (*Mus musculus*) de fenotipo silvestre (WT) y Fmr1 KO (modelo del síndrome del X Frágil) de 0 días postnatales.

#### 4.2.1.1. Tratamiento con poli-L-lisina de cubreobjetos y placas de cultivo

Para la correcta adhesión de las células al soporte del cultivo es necesario un tratamiento previo de los cubreobjetos y/o placas de cultivo con poli-L-lisina, un polícatión que polimeriza y crea una matriz adherente para la fijación y crecimiento de las neuronas. Para ello, los cubreobjetos circulares de 15 y 25 mm de diámetro se sumergieron en HCl 1.5M durante al menos 20 minutos, de tal modo que la superficie adquiere una densidad de cargas negativas uniforme sobre la que posteriormente pueda fijarse el poli-catiión de manera uniforme. Seguidamente, se lavaron los cubreobjetos con abundante agua ultrapura estéril (3 lavados mínimo) y se dejaron secar. A continuación, se añadieron 100 y 500  $\mu$ l de la solución comercial de poli-L-lisina sobre los cubreobjetos de 15 y 25 mm de diámetro, respectivamente y se mantuvieron a 37°C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se lavaron con agua ultrapura estéril, tal y como se ha descrito previamente, y se dejaron secar en condiciones de esterilidad, transfiriéndose posteriormente a placas de 6 pocillos, distribuyéndose en las mismas del siguiente modo: 3 cubreobjetos 15 mm diámetro/pocillo y 1 cubreobjetos de 25 mm de diámetro/pocillo.

En las placas de cultivo de 6 pocillos no se precisa del tratamiento previo con HCl 1.5 M, de tal modo que se cubrió el fondo con poli-L-lisina comercial directamente y se procedió de forma análoga a como se ha descrito para los cubreobjetos.

## Materiales y Métodos

### 4.2.1.2. Protocolo de cultivo de neuronas granulares de cerebelo

Los animales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se extrajeron los cerebelos y se sumergieron en medio EBSS frío. Seguidamente, se eliminaron las meninges así como los capilares y vasos sanguíneos. A continuación, los cerebelos se transfirieron a un medio que contenía la solución de papaína (12,5 U/ml), DNasa I (600 U/ml), 2 mM CaCl<sub>2</sub> y 2 mM MgCl<sub>2</sub>. El tejido fue disgregado mecánicamente con unas tijeras de punta curva, y dicho homogeneizado se incubó durante 50 minutos a 37°C en un agitador orbital a 250 rpm, para facilitar el proceso de digestión enzimática y disgregación celular.

Transcurrido el tiempo de digestión, la suspensión celular se pipeteó sucesivas veces con una pipeta serológica de 10 ml para disgregar los posibles agregados celulares, evitando la formación de burbujas. La mezcla resultante, se centrifugó durante 5 minutos a 110xg, descartándose el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en una solución de ovomucoide de 1mg/ml en EBSS. Esta solución se añadió sobre otra más concentrada de 10 mg/ml de ovomucoide en EBSS y se centrifugó, de nuevo, durante 5 minutos a 110xg. El precipitado obtenido, con las células sedimentadas, se resuspendió en medio de cultivo Neurobasal A suplementado con B27 1x, Glutamax 1x, solución antibiótica-antimicótica 1x y KCl 25 mM y se procedió al contaje de células como se detalla a continuación.

Se preparó una dilución 1:10 (v/v) de la suspensión celular en medio de cultivo, diluyéndose una vez más esta mezcla 1:2 con azul Tripán, un colorante vital que permite el contaje de células en un microscopio óptico. La mezcla resultante, así obtenida, se depositó en una cámara de Neubauer y se procedió al contaje de las células en los diferentes campos. Posteriormente se calculó la densidad celular (expresado en cel/ml) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Células/ml} = \text{N}^{\circ} \text{ células contadas} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

siendo el factor de dilución 20 (diluciones seriadas 1:10 y 1:2 con medio de cultivo y azul Tripán, respectivamente) y 10<sup>4</sup> el factor de conversión del volumen del cuadrante de la cámara (10<sup>-4</sup>ml) para su expresión en ml.

## Materiales y Métodos

Las células se sembraron en medio de cultivo (cuya composición se detalla más arriba) a las densidades requeridas en función del tipo de experimento a realizar.

Para experimentos en célula viva, la densidad fue de  $3 \times 10^5$  células/cubreobjeto (15 mm de diámetro) y  $1 \times 10^6$  células/cubreobjeto (25 mm de diámetro). Para la extracción de proteínas, extracción de ARNm y microscopía electrónica de transmisión, la densidad fue de  $3 \times 10^6$  células/pocillo en placas de 6 pocillos.

Posteriormente, transcurridas 24h desde la finalización del cultivo, se substituyó el medio por medio fresco al que se añadió 10  $\mu$ M de citosina  $\beta$ -D-arabinofuranósido para inhibir la proliferación glial.

### 4.2.1.3. Protocolo de cultivo de neuronas corticales de cerebro

Los ratones de 0 DIV se sacrificaron por decapitación y se disecaron las cortezas cerebrales con la ayuda de una lupa. En este procedimiento, es importante mantener en todo momento los cerebros en medio EBSS frío y eliminar completamente cualquier resto de tejido de hipocampo y de estriado.

Una vez obtenidas las cortezas, se disgregaron mecánicamente con tijera de punta curva en la solución de digestión con papaína tal y como está descrito en el apartado 4.2.1.2. La mezcla resultante se dejó digerir durante 45 minutos a 37°C en un agitador orbital a 250 rpm.

El resto del procedimiento experimental es análogo al cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata descrito en el apartado 4.2.1.2, a excepción de la densidad de células a sembrar y la composición del medio de cultivo. A tal efecto, se empleó medio de cultivo Neurobasal A suplementado con B27 1x, Glutamax 1x y solución antibiótica-antimicótica 1x, sin añadir KCl adicional. La densidad de siembra fue de 250.000 células/cubreobjeto de 15 mm de diámetro y 750.000 células/cubreobjeto de 25 mm de diámetro. En esta modalidad de cultivo, se utilizaron las células para experimentación a 14 DIV, remplazándose el medio de cultivo por medio fresco a las 24h. Posteriormente cada 3-4 días se remplazaba la mitad del volumen de medio por medio fresco. En dicho medio, en ningún caso se adicionó citosina  $\beta$ -D-arabinofuranósido.

## Materiales y Métodos

### 4.2.1.4. Transfección celular mediante electroporación

Para la realización de determinados experimentos fue necesaria la transfección celular a 0 DIV con un plásmido portador de la construcción vGluT1-pHluorina. Se trata de una proteína de fusión compuesta por el transportador vesicular de glutamato unido a una GFP modificada sensible al pH.

Para ello, se tomaron  $4-5 \times 10^6$  células de la suspensión obtenida y se transfirieron a tubos de centrifuga de 1.5 ml. Dichos tubos, se centrifugaron a 245xg durante 2 minutos, y las células precipitadas se resuspendieron en 100  $\mu$ l de solución nucleofectora, añadiéndose 1  $\mu$ g del plásmido vGluT1-pHluorina. La mezcla así obtenida se incubó a 37°C durante 10 minutos y seguidamente se transfirió a una cubeta de electroporación estéril. La electroporación se llevó a cabo en un equipo AMAXA con el programa O-003 "Chicken Hippocampus Hight Viability", programa con el que se consigue una gran eficiencia de transfección y alta viabilidad celular (Lopez-Jimenez *et al.* 2009).

En la misma cubeta en la que realizó la transfección se añadió, inmediatamente después, 500  $\mu$ l de medio de cultivo atemperado a 37°C. Seguidamente se transfirieron los 600  $\mu$ l a un nuevo tubo de centrifuga de 1.5 ml estéril hasta la siembra. Es conveniente realizar esta siembra sobre cubreobjetos circulares previamente sumergidos en medio de cultivo atemperado a 37°C con el fin de minimizar los cambios de temperatura de las células. A tal efecto, sobre cada pocillo que previamente contiene 1,2 ml de medio atemperado, se adicionaron 300  $\mu$ l de la suspensión de células transfectadas. Transcurridas 2h, se añadió medio de cultivo suplementado hasta completar un volumen final de 3 ml por pocillo. Al igual que para las células no transfectadas, el cambio de medio se realizó a las 24h, sin añadir citosina  $\beta$ -D-arabinofuranósido.

### 4.2.2. Western Blot

Esta técnica fue empleada para la detección y cuantificación de proteínas tal y como se detalla a continuación.

## Materiales y Métodos

### 4.2.2.1. Extracción de proteínas

Se emplearon células cultivadas a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/pocillo. Se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron con tampón PBS a 37°C (del inglés "Phosphate Buffer Solution"; en mM: 137 NaCl, 27 KCl, 100  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 18  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4). A continuación, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de tampón RIPA con inhibidores de proteasas, se raspó el fondo de los pocillos para levantar la monocapa de células y se mantuvo 15 minutos a 4°C. Los extractos así obtenidos fueron transferidos a tubos de centrifuga de 1,5 ml y se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000xg. Se recolectaron los sobrenadantes con las proteínas de interés y se descartaron los precipitados. La concentración de proteínas de las diferentes muestras se cuantificó mediante el método de Bradford.

### 4.2.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida, transferencia y densitometrado

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 8% (p/v). Para ello, se preparó un gel concentrante (4% (p/v) acrilamida, 125mM Tris, 0,1% SDS (p/v), en un volumen final de 10 ml; posteriormente se añadió 0,05% persulfato amónico (p/v) y 12  $\mu\text{l}$  de TEMED como catalizadores de la polimerización) y un gel separador (8% acrilamida (p/v), 375 mM Tris, 0,1% SDS (p/v), 0,05% persulfato amónico (p/v) en un volumen final de 12 ml; posteriormente se añadió 6  $\mu\text{l}$  de TEMED).

A las muestras, obtenidas según se ha descrito en el apartado anterior, se les adicionó tampón de carga 5x (10% SDS (p/v), 50% glicerol (v/v), 312 mM Tris, 0,01 Azul de Bromofenol (p/v), 25%  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v)) para obtener una dilución 1x del mismo con la suspensión de proteínas. Las mezclas obtenidas fueron sometidas a desnaturalización térmica (10 minutos a 90°C).

Las muestras y los patrones de peso molecular se cargaron en los diferentes pocillos del gel y se desarrolló la electroforesis a amperaje constante de 20 mA/gel en tampón de electroforesis (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% SDS (v/v)). Una vez concluida la electroforesis, los geles se equilibraron en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192mM Glicina, 20% metanol (v/v)) durante 10 minutos y se procedió a realizar la transferencia a amperaje constante de 300 mA durante 2h a 4°C en el propio tampón de transferencia.

## **Materiales y Métodos**

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se lavaron con tampón PBS 1x para eliminar cualquier traza de metanol y se bloquearon con la solución Odyssey Blocking Buffer durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de bloqueo, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios a la dilución correspondiente (tabla 2) en Odyssey Blocking Buffer con Tween-20 al 0,1% (v/v), a 4°C durante toda la noche.

Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS/Tween-20 al 0,1% (v/v) y las membranas se incubaron en la solución Odyssey Blocking Buffer/Tween-20 0,1% (v/v)/SDS 0,01% (p/V) durante 1h con los anticuerpos secundarios correspondientes a la dilución indicada (tabla 3). Los anticuerpos secundarios están marcados con fluoróforos que absorben en el infrarrojo. Transcurrida la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS 1x/Tween-20 al 0,1% y un lavado adicional exclusivamente con PBS 1x. Las membranas, una vez secas, fueron escaneadas con el equipo Odyssey Infrared Imaging System, equipado con un software que permite la detección, análisis y cuantificación de las bandas de interés.

### **4.2.3. Estudios del ciclo vesicular**

A lo largo de este trabajo se han llevado a cabo numerosos estudios de imagen en célula viva para monitorizar el ciclo vesicular sináptico en neuronas granulares de cerebelo de rata y corticales de ratón. Se emplearon para ello diferentes condiciones y protocolos de estimulación como se detalla más adelante. Dichos estudios se llevaron a cabo mediante dos abordajes experimentales diferentes: la sonda fluorescente FM1-43 y el reportero codificado genéticamente vGluT1-pHluorina.

#### **4.2.3.1. FM1-43**

Se trata de una sonda de naturaleza anfipática cuya estructura recuerda a la de un fosfolípido (fig 24). Dicha molécula se inserta en las membranas biológicas y es en este entorno hidrofóbico donde emite fluorescencia cuando se excita con luz de 479 nm de longitud de onda, mientras que su liberación a un medio acuoso produce el apagamiento de su fluorescencia. Debido a esta propiedad, dicha molécula permite monitorizar el ciclo vesicular (Cousin 2008).

## Materiales y Métodos

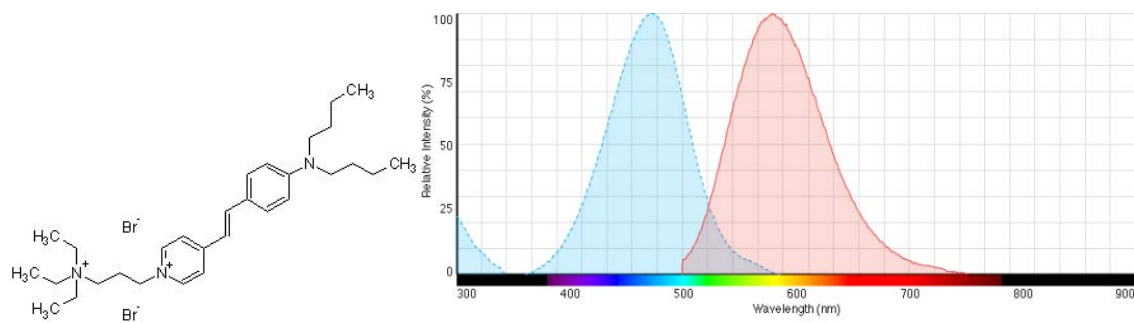


Figura 24: Estructura química de la sonda fluorescente FM1-43 (izquierda) y espectros de absorción ( $\lambda_{\text{exc máx}} = 479 \text{ nm}$ ) y emisión de la sonda (derecha).

La sonda se incorpora en las membranas de las vesículas cuando las neuronas son estimuladas en su presencia. Para ello, se empleó un estímulo químico basado en un medio con elevada concentración de potasio (KCl 50 mM) que provoca la despolarización de las membranas, la entrada de calcio en los terminales sinápticos a través de los canales de calcio sensibles a voltaje y la subsiguiente exocitosis y endocitosis compensatoria. Este último proceso atraparà la sonda presente en el medio de estimulación incorporándola a las membranas vesiculares. A continuación, es necesario eliminar la sonda unida a la membrana plasmática, de tal modo que el marcaje fluorescente sólo sea el vesicular.

Finalizado el periodo de lavado comienza la monitorización de las células. Para ello, se adquieren imágenes, de los botones sinápticos marcados fluorescentemente con la sonda, durante unos 30 segundos previos a la estimulación, de tal modo que permita la visualización de la línea base. A continuación, las células se estimulan de nuevo, (mediante perfusión con 50 mM KCl o estimulación eléctrica), para provocar la exocitosis de las vesículas previamente marcadas y la liberación de la sonda al medio acuoso. El apagamiento de la fluorescencia es proporcional a la liberación de las vesículas previamente marcadas durante el primer estímulo.

Posteriormente, un análisis semi-automatizado permite identificar los botones sinápticos individualizados definiendo regiones de interés (del inglés, ROI) y analizar simultáneamente el comportamiento de múltiples botones sinápticos de una misma muestra.

## Materiales y Métodos

En este tipo de estudios se emplearon dos tampones distintos: HBM de reposo, (con baja concentración de KCl), empleado para los lavados y la adquisición de la línea base, y HBM de estimulación (con elevada concentración de KCl) empleado para los estímulos conducentes a la carga de la sonda en la preparación y su posterior descarga, cuya composición se indica a continuación.

**HBM de reposo (en mM):** 140 NaCl, 5 KCl, 5 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1,33 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 HEPES; pH 7,4.

**HBM de estimulación (en mM):** 95 NaCl, 50 KCl, 5 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1,33 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 HEPES; pH 7,4.

En estos experimentos, se usaron neuronas granulares de cerebelo de rata de 7-9 DIV y corticales de ratón de 14-16 DIV. Dichas células se lavaron durante 10 minutos con medio HBM de reposo a 37°C. Seguidamente, se incubaron con la sonda fluorescente FM1-43 (10 µM) durante 90 segundos a 37°C con medio de estimulación. Transcurrido este periodo, el cubreobjetos con las células se lavó con medio HBM de reposo y se montó en la cámara de perfusión sobre la pletina del microscopio, conectándose al sistema de perfusión (termostatizado a 37°C y con un flujo de 1 ml/min).

A continuación se dejó la preparación 10 minutos lavando, con medio HBM de reposo en perfusión, con el objeto de eliminar el exceso de sonda unida a la membrana plasmática y, posteriormente, se procedió a la adquisición de imágenes en las condiciones detalladas:

- Objetivo: 60x oil
- excitación: 479 nm
- Ventana: 1004x1002 pixel
- Tiempo de exposición: 0.067 segundos
- Ganancia electrónica: 50
- Pre-Amplificación de la ganancia: 3.80
- Profundidad de campo (en bits): 14
- Tasa de adquisición de imágenes: 1 Hz

## Materiales y Métodos

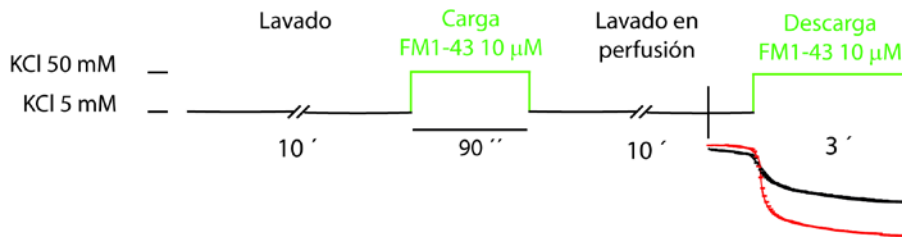


Figura 25: Esquema del protocolo estándar de monitorización con FM1-43. 10 minutos de lavado, 90 segundos de carga de FM1-43 en presencia de HBM de estimulación, 10 minutos de lavado del exceso de sonda y 2-3 minutos de perfusión de HBM de estimulación (50 mM KCl) para inducir la descarga de la sonda.

A partir de este protocolo estándar de monitorización de FM1-43 (fig 25) se diseñaron una serie de variantes del mismo para los diferentes experimentos llevados a cabo, en los que se modificaron los tiempos de lavado o incubación previos a la carga (con o sin tratamientos farmacológicos) o posteriores a la carga de la sonda FM1-43. Los diferentes protocolos ensayados se detallan a continuación.

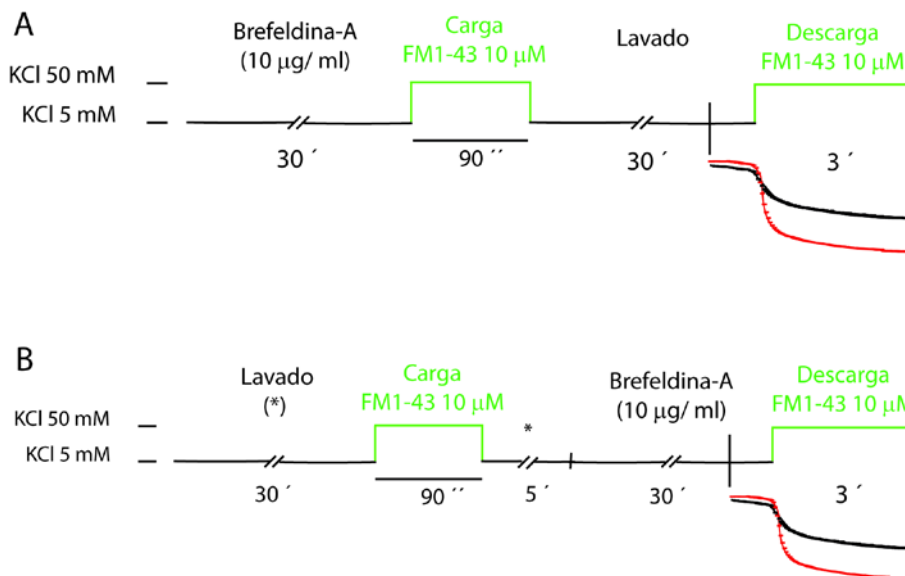


Figura 26: Esquema del protocolo de FM1-43 empleado en preparaciones tratadas con Brefeldina-A durante los 30 minutos previos a la carga de la sonda (A) y tratadas con Brefeldina-A (30 min) comenzando tras 5 minutos de lavado en medio HBM de reposo después de la carga de FM1-43 (B).

## Materiales y Métodos

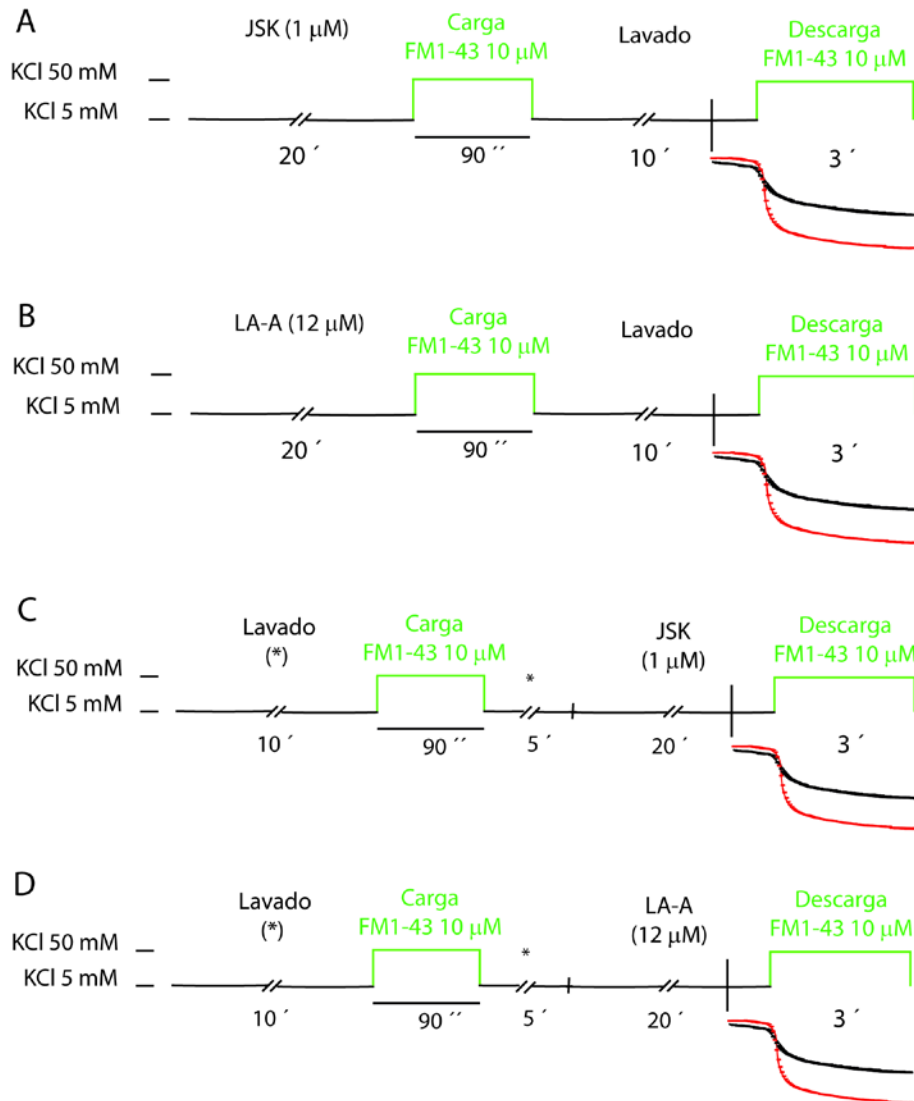


Figura 27: Esquema del protocolo de FM1-43 empleado en preparaciones tratadas con Jasplakinolida (A) o Latrunculina (B) durante los 20 minutos previos a la carga de la sonda y tratadas con Jasplakinolida o Latrunculina A (20 min) comenzando tras 5 minutos de lavado en medio HBM de reposo, después de la carga de FM1-43 (C y D respectivamente).

Es importante destacar que para todos los protocolos anteriores con tratamientos farmacológicos se realizaron, en paralelo, los correspondientes controles en medio HBM de reposo manteniendo los mismos tiempos de incubación.

## Materiales y Métodos

### 4.2.3.1.2. Descarga de FM1-43 evocada mediante estimulación eléctrica

Una variante de los estudios de FM1-43 llevados a cabo en este trabajo consistió en la descarga de la sonda mediante la aplicación de diferentes estímulos eléctricos empleando un estimulador de campo. En los diferentes protocolos de estimulación empleados se mantuvo la configuración de cada estímulo o PA en: 35 mA de intensidad de corriente, 1ms de duración y un periodo refractario interestímulo de 48 ms.

En neuronas granulares de cerebelo de rata se aplicaron los siguientes estímulos para analizar de forma comparativa la descarga de FM1-43 con KCl 50 mM y sendos estímulos:

- 2 trenes consecutivos de 900 PA a una frecuencia de 20 Hz
- 2 trenes consecutivos de 900 PA a una frecuencia de 40 Hz

En neuronas corticales de cerebro de ratón WT y Fmr1 KO se aplicaron los siguientes estímulos:

- 1 tren de 40 PA a una frecuencia de 20 Hz: para la depleción del RRP
- 1 tren de 900 PA a una frecuencia de 20 Hz: para movilizar el RP

### 4.2.3.2. vGluT1-pHluorina

Las pHluorinas son indicadores de pH codificados genéticamente diseñadas inicialmente por Miesenbock (Miesenbock *et al.* 1998), ampliamente utilizadas en el estudio del ciclo vesicular (Kavalali & Jorgensen 2014). En el caso particular de vGluT1-pHluorina, se trata de una proteína de fusión compuesta por una pHluorina supereclíptica sensible al pH unida al dominio luminal del transportador vesicular de glutamato de tipo I (Voglmaier *et al.* 2006). Ante una estimulación, las vesículas se fusionan con la membrana plasmática, quedando orientada la GFP hacia el exterior celular, más alcalino, (pH~7.4), registrándose, de este modo, un incremento en la fluorescencia proporcional al número de vesículas exocitadas. Posteriormente, tras la endocitosis, y subsiguiente re-acidificación de las vesículas, la fluorescencia disminuye regresando a niveles basales (fig 28). Adicionalmente, y con la finalidad de disponer de un máximo de señal al cual relativizar la respuesta exocitótica, se perfunde NH<sub>4</sub>Cl,

## Materiales y Métodos

un compuesto alcalino que difunde a través de las membranas en la forma de  $\text{NH}_3$  y alcaliniza el lumen vesicular, permitiendo así visualizar la fluorescencia de todas las copias de vGluT1-pHluorina, lo que equivale a la fluorescencia del "pool" total de vesículas.

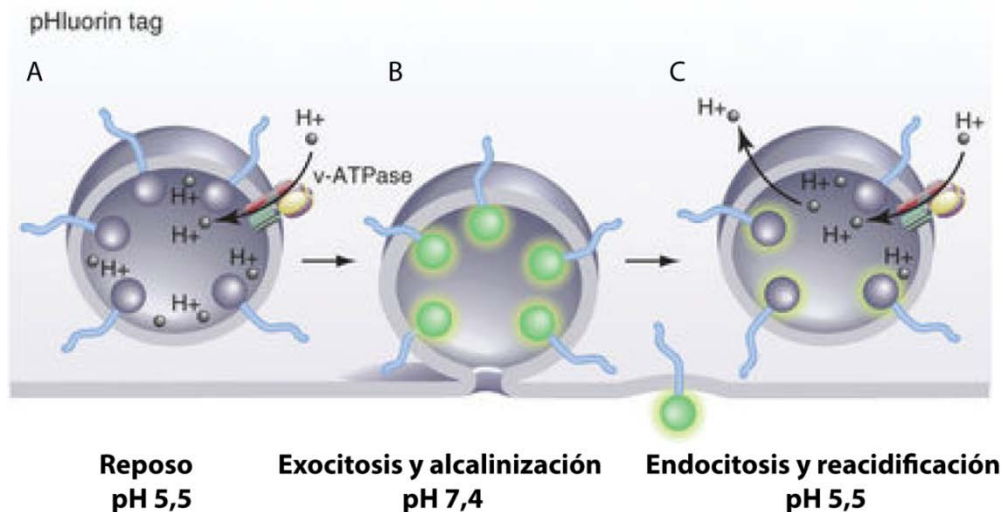


Figura 28: Esquema gráfico de los cambios de fluorescencia de vGluT1-pHluorina que acontecen como resultado del cambio de pH al que se ve expuesto el reportero en las distintas etapas de ciclo vesicular. En el estado de reposo, la fluorescencia se mantiene apagada en el lumen vesicular a un pH de 5,5. Como resultado de la estimulación, la exocitosis acarrea la fusión vesicular y la alcalinización del lumen de las vesículas, lo que promueve un marcado incremento de la fluorescencia. Posteriormente, tras la endocitosis compensatoria y posterior re-acidificación vesicular, la fluorescencia retorna a niveles basales. Adaptado de Kavalali & Jorgensen 2014.

Una variante de estos experimentos contempla la perfusión de bafilomicina A1 durante los 30 segundos previos al registro de la línea base y durante todo el periodo monitorizado. Dicho compuesto es un inhibidor de la bomba V-ATPasa, responsable de la re-acidificación vesicular, de tal modo que la presencia de dicho compuesto durante el curso temporal del experimento permite obtener una medida acumulativa de la exocitosis registrada.

Esta técnica de imagen presenta una serie de ventajas frente al empleo de FM1-43. En primer lugar, permite el análisis de botones sinápticos sin la necesidad de una

## Materiales y Métodos

estimulación previa para incorporar el marcaje. Por otro lado, monitoriza la fase de endocitosis compensatoria que tiene lugar tras la exocitosis. Por último, posibilita la aplicación de varias estimulaciones en un mismo campo, lo que resulta de gran utilidad a la hora de evaluar el efecto de diferentes tratamientos, disponiendo así de un control interno, o bien para medir la endocitosis neta en experimentos combinados en presencia y ausencia de bafilomicina A1.

En este tipo de estudios se emplearon 3 tipos de tampones cuya composición se detalla a continuación: HBM de reposo, para los tiempos de reposo y adquisición de la línea base, HBM de estimulación y HBM con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , usado al final de los experimentos para visualizar el total de copias de vGluT1-pHluorina.

**HBM de reposo (en mM):** 140 NaCl, 5 KCl, 5  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 1,33  $\text{CaCl}_2$ , 10 glucosa y 10 HEPES; pH 7,4.

**HBM de estimulación (en mM):** 95 NaCl, 50 KCl, 5  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 1,33  $\text{CaCl}_2$ , 10 glucosa y 10 HEPES; pH 7,4.

**HBM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (en mM):** 90 NaCl, 50  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 1,33  $\text{CaCl}_2$ , 10 glucosa y 10 HEPES; pH 7,4.

En la realización de estos experimentos se usaron neuronas granulares de cerebelo de rata de 7-9 DIV previamente transfectadas con el plásmido que porta la construcción vGluT1-pHluorina mediante el método de electroporación previamente descrito (apartado 4.2.1.3.). Para ello, las células se lavaron 10 minutos en HBM de reposo a 37°C. A continuación se montó el cubreobjetos en la cámara de perfusión sobre la pletina del microscopio de epifluorescencia, se conectó al sistema de perfusión (1 ml/min a 37°C) y se procedió a la toma de imágenes de acuerdo a las siguientes condiciones de adquisición:

- Objetivo: 60x oil
- $\lambda$  excitación: 475 nm
- Ventana: 1004x1002 pixel
- Tiempo de exposición: 0.25 segundos
- Ganancia electrónica: 100
- Pre-Amplificación de la ganancia: 3.80

## Materiales y Métodos

- Profundidad de campo (en bits): 14
- Tasa de adquisición de imágenes: 4 Hz (se adquieren 4 imágenes y se promedian para mejorar la relación señal-ruido, originando una tasa real de adquisición de 1 Hz).

Durante el monitorizado del experimento, se adquirieron 30 segundos de línea base seguidos de 10 segundos de estimulación mediante perfusión de HBM 50 mM KCl. Transcurrido este periodo, se perfundió de nuevo HBM de reposo para la recuperación de los niveles de fluorescencia basal de los botones sinápticos y posteriormente se perfundió NH<sub>4</sub>Cl durante 30 segundos, una alcalinización química de vGluT1-pHluorina que permite la normalización de la respuesta de la estimulación al máximo de señal de fluorescencia (fig 29).

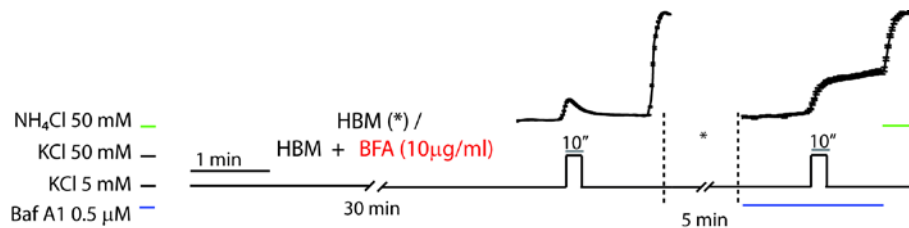


Figura 29: Esquema del protocolo de vGluT1-pHluorina empleado en preparaciones tratadas con BFA 30 minutos. Finalizada la incubación, comienza la adquisición de la línea base durante 30 segundos con perfusión de HBM de reposo. A continuación, se perfunde HBM de estimulación durante 10 segundos y seguidamente se perfunde HBM de reposo, de nuevo, durante 1 minuto para que los botones sinápticos retornen a sus valores de fluorescencia basales. Posteriormente se perfunde HBM con NH<sub>4</sub>Cl para obtener el máximo de señal fluorescente. Acto seguido se mantiene el mismo campo enfocado en perfusión de HBM de reposo en presencia o ausencia de Brefeldina A durante 5 minutos, y 50 segundos previos a la adquisición de la nueva línea base se perfunde HBM de reposo con 0,5 μM de Bafilomicina A1 para inhibir la re-acidificación vesicular. En este punto, el resto del protocolo experimental es análogo al descrito previamente, con la salvedad de que en todos los medios de perfusión, a excepción del HBM NH<sub>4</sub>Cl, contienen 0,5 μM de Bafilomicina A1.

# Materiales y Métodos

## 4.2.4. Microscopía electrónica de transmisión

### 4.2.4.1. Microscopía electrónica de transmisión convencional

Para la realización de los estudios de ultraestructura mediante microscopía electrónica de transmisión se emplearon los tampones descritos a continuación:

#### **Tampón HBM de reposo con Advasep-7 1 mM**

**Tampón Millonig (Tampón fosfato 0,13M, pH 7,3):** 1,87% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (p/v), 0.38% NaOH (p/v).

**Solución fijadora:** Para-formaldehído 4%, Glutaraldehído 2,5% en tampón Millonig.

**Solución post-fijación:** OsO<sub>4</sub> 1%, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 1,5% en agua destilada.

**Soluciones de deshidratación:** soluciones de concentración creciente de etanol. Expresadas en % etanol/agua (v/v): 30, 50, 70, 80, 90, 95 y etanol absoluto.

En la realización de estos experimentos se usaron células granulares de cerebelo de rata de 7 DIV y corticales de ratón de 14 DIV. Los dos tipos celulares sembrados en cubreobjetos circulares de 15 mm de diámetro se sometieron al mismo procedimiento experimental. Las células se mantuvieron en los cubreobjetos hasta el final del procedimiento, cuando una vez embebida la monocapa en resina pura y habiendo polimerizado, se despegó con nitrógeno líquido.

Este tipo de estudios tienen por objeto el análisis ultraestructural de los botones sinápticos bajo los mismos tratamientos y estímulos ensayados en los experimentos en célula viva con FM1-43. Para ello, se emularon las condiciones de reposo y estimulación en dichos experimentos empleando los tampones HBM de reposo y de estimulación previamente descritos en co-administración con los fármacos empleados en los distintos experimentos (protocolos experimentales descritos en las fig 25, 26 y 27).

Una vez finalizados los protocolos de estimulación y/o tratamientos, las células se fijaron con para-formaldehído 4% y glutaraldehído 2,5% a 4°C al menos durante 3 horas (habitualmente durante la noche).

## Materiales y Métodos

Transcurrido el proceso de fijación, las células se lavaron 3 veces con tampón Millonig y seguidamente se sometieron a un proceso de post-fijación con  $\text{OsO}_4$  1%,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  1,5% durante 1h. La osmicación aporta contraste a las membranas, facilitando, de este modo, la posterior visualización de estructuras celulares. A continuación, las preparaciones se lavaron 3 veces con agua destilada y se deshidrataron con soluciones de etanol de concentración creciente, incubando 5 minutos en cada una de ellas: etanol 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y etanol absoluto (2x).

Una vez deshidratadas las muestras, se procedió a su inclusión en resina "SUPURR low viscosity". Para ello, las muestras se fueron embebiendo en soluciones de resina/etanol cada vez más concentradas hasta su inclusión en resina pura como se indica:

- Resina/etanol 1/3 (v/v) 1 hora
- Resina/etanol 1/1 (v/v) 1 hora
- Resina/etanol 3/1 (v/v) 2 horas
- Resina pura toda la noche

Finalmente, se sustituyó la resina por resina pura fresca y se mantuvo al menos 48h a  $70^\circ\text{C}$  para que ésta polimerice.

Los bloques, con las células embebidas en la resina polimerizada, se llevaron al centro nacional de microscopía electrónica, donde tras despegar el cobreobjetos con nitrógeno líquido, se tiñeron con citrato de plomo y se cortaron en secciones ultrafinas para su posterior visualización y análisis.

### 4.2.4.2. Microscopía electrónica de transmisión con fotoconversión

Esta modalidad de microscopía electrónica combina la resolución ultraestructural propia de la técnica con el marcaje funcional de aquellos orgánulos (vesículas sinápticas y endosomas) que han participado en el ciclo vesicular sináptico. Los tampones y soluciones empleadas fueron los siguientes:

**Tampón fosfato salino (del inglés, PBS; en mM):** 138 NaCl, 3 KCl, 8,1  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 1,5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4.

**Tampón glicina 0,1M pH 7,4**

## Materiales y Métodos

**Tampón NH<sub>4</sub>Cl 0,1M pH 7,4**

**Tampón cacodilato sódico 0,1M pH7.4**

**Solución de fijación:** para-formaldehído 2% (p/v) y glutaraldehído 2% (v/v)

**Solución post-fijación:** OsO<sub>4</sub> 1%, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 1,5% en agua destilada.

**Tampón ácido tánico 0,05M en tampón cacodilato sódico 0,1M pH 7,4.**

**Soluciones de deshidratación:** soluciones de concentración creciente de etanol. Expresadas en % etanol/agua (v/v): 30, 50, 70, 80, 90, 95 y etanol absoluto.

El procedimiento experimental es análogo al descrito en la microscopía electrónica convencional (apartado 4.2.4.1.), por lo que únicamente se detallan aquellas modificaciones requeridas para el marcaje con fotoconversión (Darcy *et al.* 2006).

En este tipo de estudios se analizó el efecto a nivel ultra-estructural de los fármacos latrunculina-A (12 $\mu$ M) y Jasplakinolida (1 $\mu$ M) sobre el ciclo vesicular. Para ello, se realizaron incubaciones con dichos fármacos durante 20 minutos previos y posteriores a la carga del análogo fijable de FM1-43 (FM1-43<sub>FX</sub>) y se realizó la carga de la sonda (FM1-43<sub>FX</sub>) emulando las condiciones ensayadas en los estudios de imagen en célula viva (esquemas A-D fig 27). Una vez finalizada la carga de la sonda, las células se lavaron en medio HBM de lavado fresco durante 1 min y a continuación se incubaron durante 1 min en HBM de lavado con 1 mM de Advasep-7 para eliminar el exceso de FM1-43 unido de forma inespecífica a la membrana plasmática.

A continuación, se procedió a la fijación de las células empleando la solución de fijación previamente indicada (para-formaldehído 2% (p/v) y glutaraldehído 2% (v/v)) a 4°C durante, al menos, 1 hora. Finalizado este periodo, se lavó la preparación con tampón glicina 0,1M pH7,4 durante 1h y seguidamente con tampón NH<sub>4</sub>Cl 0,1M, con el objeto de neutralizar la solución de fijación. En este punto, y tras realizar 3 lavados de las células con tampón PBS, se pueden almacenar las preparaciones a 4°C hasta 3 días.

Para el proceso de marcaje mediante fotoconversión de las vesículas previamente marcadas con FM1-43<sub>FX</sub>, cada uno de los cubreobjetos con las células sembradas se incubó durante 10 minutos con una solución de 3,3'-di-aminobencidina (1mg/ml en agua destilada) a temperatura ambiente. A continuación, el cubreobjetos se colocó en

## Materiales y Métodos

la pletina de un microscopio de epifluorescencia y se iluminó de forma continua con luz monocromática de  $\lambda$  479 nm durante 40 minutos, añadiendo 3,3'-di-aminobencidina fresca sobre la preparación para evitar que ésta se secase. En este proceso, la iluminación continuada de la sonda desencadena la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en aquellos orgánulos marcados por la sonda. Dichas moléculas altamente reactivas inician un proceso de polimerización oxidativa de DAB en dichos orgánulos y da lugar a la formación de un precipitado electro-denso de color oscuro tras la post-fijación (Grabenbauer 2012). Dado el aspecto oscuro de estas vesículas en contraposición a aquellas de lumen claro es posible discriminar entre vesículas fotoconvertidas ( $PC^+$ ) y no fotoconvertidas ( $PC^-$ ), y por tanto identificar aquellas que han participado en el ciclo vesicular (fig 30).

En este procedimiento experimental, y tras la post-fijación con  $OsO_4$  1%,  $K_3[Fe(CN)_6]$  1,5%, se lavaron las preparaciones 3 veces con tampón cacodilato sódico 0,1M y a continuación se incubaron con una solución de ácido tánico 0,05M, en tampón cacodilato sódico, durante 45 minutos. Este paso permite un mejor contraste de las membranas en esta modalidad de MET. Transcurrido este periodo, se reemplaza la solución de ácido tánico por sulfato sódico anhidro 0,05M, en tampón cacodilato sódico, durante 5 minutos. A continuación, las células se lavaron 3 veces con agua destilada y se procedió a las deshidrataciones con soluciones de etanol de concentración creciente e inclusiones en resina tal y como se ha detallado en el apartado 4.2.4.1.

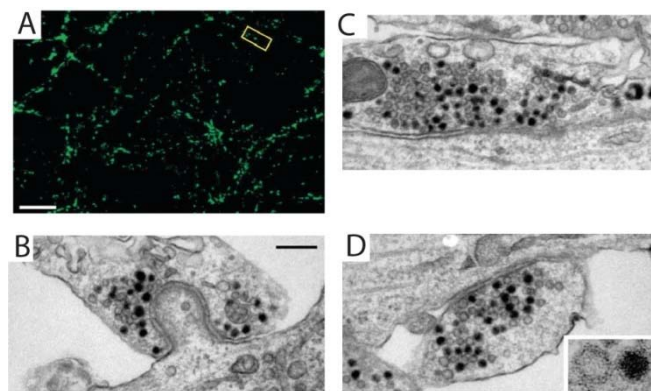


Figura 30: Imágenes de microscopía electrónica correlativa de neuronas hipocampales de rata marcadas mediante la técnica de fotoconversión de FM1-43<sub>FX</sub> en presencia de DAB. En los

## Materiales y Métodos

paneles se ilustra un campo de neuronas hipocampales marcadas con FM1-43<sub>FX</sub> (A) y 3 terminales sinápticos con vesículas fotoconvertidas (PC<sup>+</sup>; lumen oscuro) y no fotoconvertidas (PC<sup>-</sup>, lumen claro) (B-D). Adaptado de Darcy *et al.* 2006.

### **4.2.4.3. Microscopía electrónica de transmisión con marcaje de endosomas con HRP y peróxido de hidrógeno**

Esta modalidad de MET fue empleada en estudios de ultraestructura de neuronas granulares de cerebelo de rata estimuladas con KCl 50 mM durante 90 segundos y fijados a diferentes tiempos tras la estimulación (inmediatamente después o transcurridos 10 minutos en medio HBM de reposo). En dichas preparaciones se analizó y cuantificó la presencia y tamaño de endosomas en los terminales sinápticos en las condiciones control y tratadas con brefeldina A (10 $\mu$ g/ml) durante 30 minutos antes de la estimulación.

El desarrollo experimental es análogo al de la microscopía electrónica convencional descrito en el apartado 4.2.4.1, a excepción del marcaje de estructuras endosomales con peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés). Para ello, se siguió el protocolo descrito por Cheung y Cousin (Cheung & Cousin 2013). La incubación con peroxidasa de rábano (10mg/ml), se llevó a cabo durante el periodo de estimulación (90 segundos KCl 50 mM). A continuación y, tras mantenerse las células el tiempo requerido en medio HBM de reposo, se fijaron con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2,5% y se lavaron dos veces con tampón Millonig. Posteriormente, se procedió al revelado de HRP, para lo cual se incubaron las preparaciones con 3,3'-diaminobencidina (1mg/ml) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,2% (v/v) hasta que se desarrolló la reacción cromogénica (aproximadamente 3-5 minutos). Posteriormente se realizaron 3 lavados con tampón Millonig y se continuó el procedimiento experimental de acuerdo a lo establecido en el apartado 4.2.4.1.

### **4.2.4.4. Microscopía electrónica de transmisión en secciones coronales de corteza cerebral de ratón**

Esta modalidad de MET fue empleada para los estudios de ultraestructura en neuronas piramidales de corteza somatosensorial de ratón.

## Materiales y Métodos

### 4.2.4.4.1. Obtención de secciones coronales de corteza somatosensorial y estimulación

Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical, posteriormente decapitados y se extrajeron los cerebros rápidamente. La disección se realizó con un medio cerebroespinal artificial (s-aCSF) frío (4°C), burbujeado con 95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. La composición del medio s-aCSF empleado es: ácido ascórbico 0,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, glucosa 10 mM, KCl 2,69 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM y picrotoxina 50 μM. Las secciones coronales, de 325 nm de espesor, se obtuvieron con un vibratomo y se dejaron estabilizar a 37°C durante 45-60 minutos en medio aCSF.

Posteriormente estas secciones fueron transferidas a una cámara de registro donde se mantuvieron en medio aCSF durante 10 minutos. A continuación, en aquellas preparaciones que fueron estimuladas, mediante un electrodo bipolar y la ayuda de un microscopio vertical, se aplicó un tren de 900 PA a una frecuencia de 20Hz en la capa V de neuronas piramidales en su región más próxima al surco central (condición 900 PA 20Hz). El resto de preparaciones, secciones en situación de reposo (basal), se mantuvieron el mismo periodo de tiempo que el periodo de estimulación (45s) en ausencia de estimulación.

### 4.2.4.4.2. Preparación de las muestras para MET

El desarrollo experimental de la preparación de MET es análogo al descrito para células en cultivo (4.2.4.1.) a excepción de las condiciones de fijación llevadas a cabo. Para ello, una vez realizadas las condiciones experimentales, las secciones de cerebro son puestas a fijar a 37°C por inmersión en glutaraldehído 3,5% (p/v) en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 durante 45 min. A continuación, las secciones se mantienen en dicha solución de fijación durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se mantienen a 4°C durante 20 horas. Una vez fijadas, las secciones se tratan con 1% de OsO<sub>4</sub>/1.5% K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 60 minutos para llevar a cabo la postfijación. A continuación las secciones se aclaran con agua destilada y se deshidratan sumergiéndolas en disoluciones de etanol de concentración creciente: etanol 30% (5 min), 50% (5 min), 70% (5 min), 90% (5 min), 95% (5 min) y 100% (2 x 5 min). Seguidamente la preparación se embebe en resina "Spurr low viscosity" con etanol 100% aumentando secuencialmente la proporción de resina en cada etapa tal y como se detalla en las proporciones resina/etanol: 1/3 (1 hora), 1/1 (1 hora), 3/1 (2 horas) y

## Materiales y Métodos

resina absoluta (12 horas o durante la noche) y se dejan polimerizar al menos 8 h (recomendable 48 h) a 70°C. Se obtienen secciones ultrafinas (70 nm) tras su tinción con citrato de plomo. Posteriormente las imágenes se obtienen en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010, tomando imágenes de las capas II/III de la corteza cerebral a 80.000 aumentos para el análisis de sinápsis y a 25.000 aumentos para el conteo de sinápsis por campo (densidad de sinápsis/campo).

### 4.2.5. Determinación de los niveles de G/ F-Actina

Este ensayo se llevó a cabo con el objetivo de evaluar el efecto que los fármacos Jasplakinolida (JSK) y Latrunculina A (LA-A) tenían sobre los niveles relativos de F/G-Actina, en condiciones basales y estimuladas.

Se usaron para ello neuronas granulares de cerebelo de rata de 7 DIV cultivadas en placa de 6 pocillos y el protocolo se desarrollo de acuerdo a lo establecido en el kit G-Actin/F-actin In Vivo Assay (Biochem Kit Cat. # BK037; Denver, CO, USA).

Para ello, las neuronas cultivadas se lavaron con HBM de reposo a 37°C durante 10 minutos y posteriormente, para los tratamientos con estimulación se incubaron durante 90 segundos con HBM de estimulación a 37°C. Los tratamientos en la condición basal se mantuvieron el mismo tiempo en HBM de reposo (composición de los medios en el apartado 4.2.3.1.).

Inmediatamente después, las células se lavaron en un tampón del kit para estabilizar la actina polimerizada (F-actina), y de este modo poder separar la actina globular (G-actina) y la polimerizada (F-actina) mediante ultracentrifugación. Tras la centrifugación, el sobrenadante contenía la actina G y el precipitado, la actina F. Esta fracción se resuspendió con un tampón específico para despolimerizar la actina-F y se cuantificaron sus niveles relativos mediante PAGE-SDS y Western-Blot. Se emplearon, para ello, los anticuerpos anti-actina policlonal generado en conejo (Cat. # AAN01; ID: AB\_10708070; Denver, CO, USA) y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo con el fluoróforo conjugado IRDye para su detección. (ID: AB\_10795015 o ID: AB\_10796098, LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska USA).

Las membranas se escanearon en un equipo "Odyssey Infrared Imaging System" y las proteínas inmunorreactivas fueron analizadas y comparadas mediante sensitometría.

# Materiales y Métodos

## 4.3. Procesamiento de los datos

### 4.3.1. Análisis de inmunodetección en membrana

Las imágenes obtenidas del escaneo de las membranas de PVDC se analizaron mediante el software incorporado del dispositivo de escaneo de membranas Li-Cor (Odyssey). A tal efecto, se midió la densidad integrada de las bandas de la proteína de interés y se normalizó con la densidad integrada de la proteína empleada como control de carga. Cuando la misma proteína se determinó en dos fracciones del mismo extracto, el resultado se presentó como la relación entre la densidad integrada de dicha proteína en ambas fracciones.

### 4.3.2. Análisis de FM1-43

Para el análisis de este tipo de experimentos fue necesario, en primer lugar, la creación de una máscara binaria que definiese las regiones de interés (ROIs) a analizar. De este modo, las variaciones de fluorescencia acontecidas en el transcurso del experimento son cuantificadas exclusivamente en aquellos ROIs que se corresponden con los botones sinápticos. Para ello se utilizó el software informático IgorPro con la rutina diseñada por Bergsman (Bergsman *et al.* 2006), con algunas modificaciones (Bartolome-Martin *et al.* 2012).

Dicho método selecciona ROIs cuyo comportamiento es compatible con el de un botón sináptico de acuerdo a 3 parámetros: I) La estabilidad de la línea base durante en el tiempo registrado; II) la relación señal/ruido de la línea base y III) el grado de descarga tras la estimulación. De acuerdo con estos parámetros, el programa selecciona regiones cuyo índice de calidad sea igual o superior a 0,1.

Esta rutina diseñada por Bergsman opera en el programa Igor Pro y genera un archivo \*.ibw, que contiene una máscara binaria con los ROIs específicos del campo de FM1-43 analizado. En paralelo a la generación de la máscara, el propio programa crea una carpeta con la descomposición de imágenes del experimento analizado con el fondo sustraído de forma automatizada, de acuerdo al método descrito por Bergsman (Bergsman *et al.* 2006).

A continuación se detalla el procesamiento informático:

## Materiales y Métodos

- 1) Se guardan las imágenes obtenidas tras la monitorización del experimento en un archivo **\*.tiff** multidimensional. Se descomponen las imágenes en una carpeta y se renombran las mismas como "cover001.tiff hasta "cover**nnn**.tiff", donde **nnn** es el número de la última imagen del archivo guardado. En esta misma carpeta se guarda la imagen de contraste de fases obtenida a la finalización del periodo monitorizado como "cel.tiff".
- 2) Se ejecuta el programa IgorPro 6.31 y se procede como se indica en la imagen de la consola del programa (fig 31). Una vez configurados los parámetros se ejecuta "go" en el panel lateral.
- 3) Finalizado el procesamiento aparece en el interfaz la opción "*leave folder alone*", que hay que validar para guardar la copia del experimento con el fondo sustraído de forma automática mediante el algoritmo de "bola rodante" (Sternberg 1983). Se accede a Data > Browse waves > Quality Segment + [nombre de la carpeta] y se guarda una copia. Este es el archivo **\*.ibw** aludido previamente que contiene la máscara binaria con los ROIs.
- 4) En el programa Image J se importan las imágenes procesadas automáticamente que se encuentran ubicadas en una subcarpeta dentro de la carpeta original mencionada en el primer paso. Para ello se accede a File > Import > Raw > y se procede como se indica en la figura 32.

## Materiales y Métodos

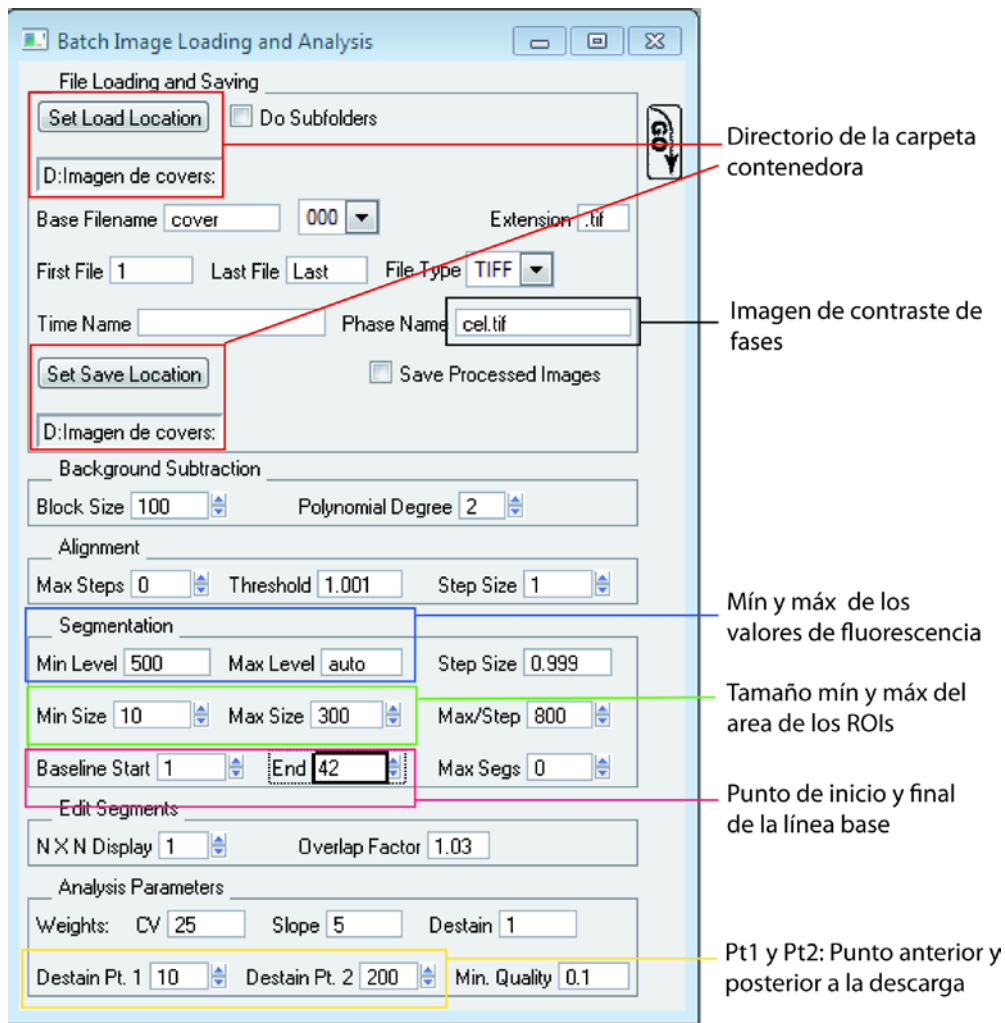


Figura 31: Consola de IgorPro empleada en el procesamiento de los experimentos de imagen con FM1-43. Se resaltan los parámetros requeridos para generar la máscara.

Este procedimiento genera un archivo \*.tiff multidimensional con las imágenes con el fondo sustraído (fig 32A). Del mismo modo, se accede a File > Import > Raw > Quality Segment y se importa la máscara en 8-bit (fig 32B). Al proceder de esta manera aparece la máscara dibujada en una ventana. Pulsando [Ctrl + Mayús + T] desplegamos el histograma que nos permite seleccionar el rango de calidad de los ROIs (0-127) que queremos considerar para el ulterior análisis. En nuestro caso, se consideró el rango 16-127, por ser los botones 0-15 los que presentan un índice de calidad inferior a 0,1. Una vez establecido, se selecciona "Apply" (en el panel inferior) y en el menú de Image J > Analyze > Analyze Particles y se configuran los parámetros

## Materiales y Métodos

de la consola tal y como se indica en la imagen 32C. En el propio menú del RoiSet generado se accede a More > Save y se guarda el archivo RoiSet.zip. Este archivo contiene los ROIs que conforman la máscara para el análisis.

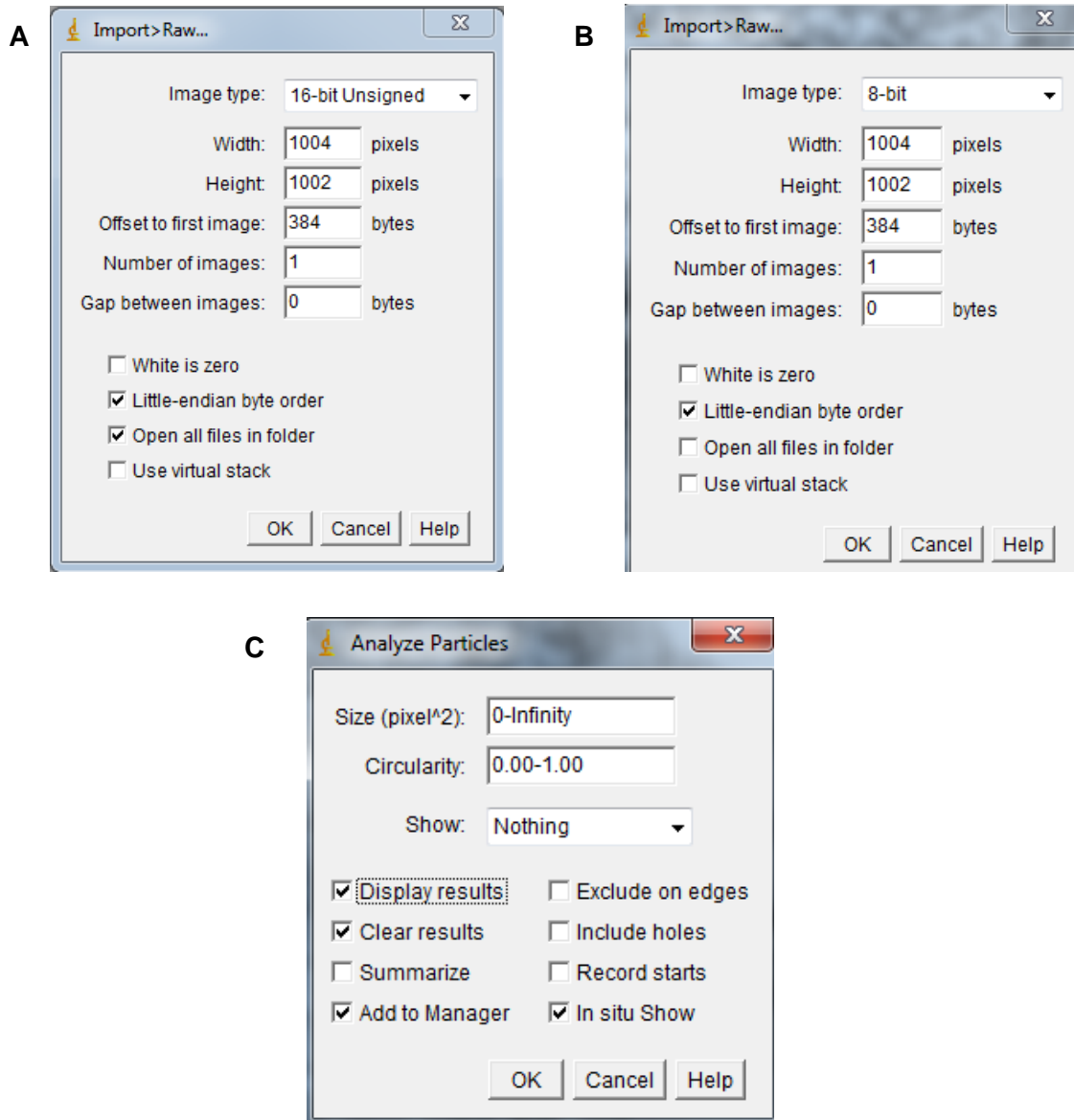


Figura 32: Configuración de opciones a seleccionar para importar el archivo multidimensional \*.tiff con las imágenes del experimento con el fondo sustraído (A), para importar la máscara (B) y para la obtención del archivo RoiSet.zip (C).

## Materiales y Métodos

5) A continuación, se añade una diapositiva en blanco con las mismas dimensiones (1004 x 1002) delante de la primera imagen del *Stack* importado (fig 33A). Para ello, manteniendo **Alt** presionado se accede a *Image > Stack > Add Slice*. Sobre este fondo, a continuación, se importa la máscara binaria contenida en el archivo *RoiSet* guardado previamente. Para ello se accede a *File > Open > RoiSet* y, una vez dentro del menú desplegable, se selecciona *More > Draw*; *More > Fill*; *More > Multimeasure*. Estas 3 acciones secuenciales dibujan la máscara binaria sobre la primera diapositiva añadida a la secuencia de imágenes (fig 33B) y mide los valores de fluorescencia (ya con el fondo sustraído) de los ROI de la máscara en todas las imágenes del archivo (fig 33C), exportando los valores en forma de tabla.

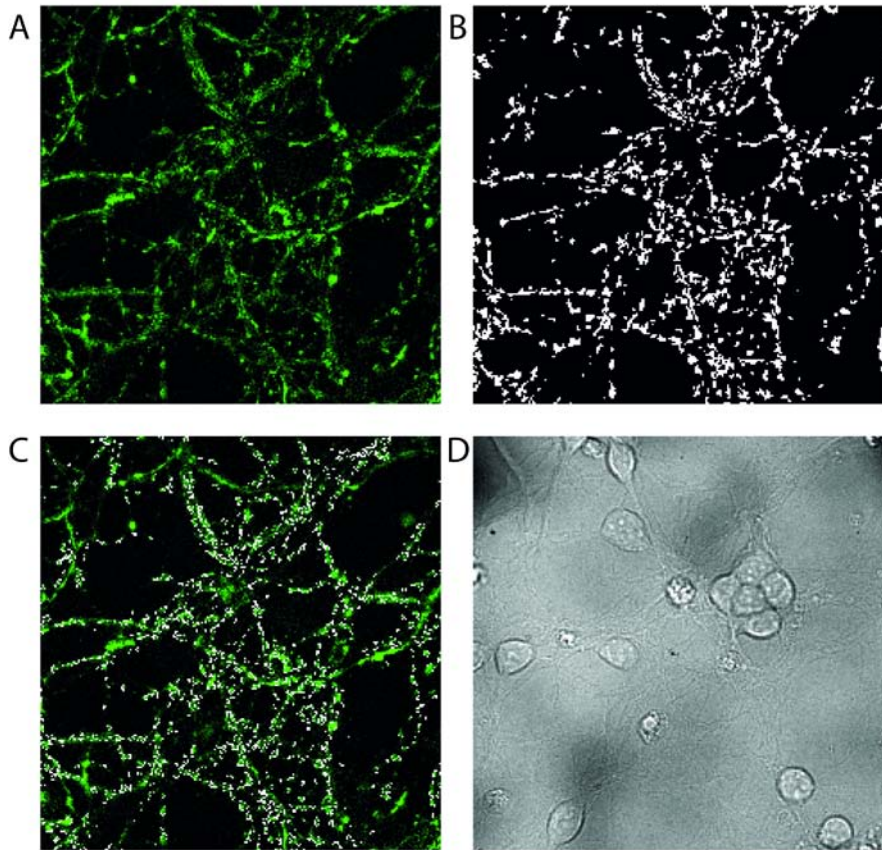


Figura 33: Campo de neuronas granulares de cerebelo de rata marcadas con FM1-43 a tiempo 0 (A); máscara binaria con los ROIs empleados para el procesamiento del experimento (B); campo de FM1-43 a  $t_0$  con los ROIs superpuestos delimitando los botones sinápticos (C); imagen de contraste de fase del campo objeto de estudio (D).

## Materiales y Métodos

6) Los datos de fluorescencia arbitraria procedentes de la tabla se pegan en una hoja de Origin Pro y se normalizan con respecto a su valor inicial utilizando Microsoft Excel. Una vez normalizados los datos vuelven a pegarse en Origin Pro para el posterior procesamiento de los mismos.

7) Los parámetros analizados con este tipo de estudios fueron: medidas de los valores de fluorescencia inicial, grado de descarga (en %), cálculo de constantes de decaimiento exponencial ( $\tau$ ), clasificación de botones en dos grupos de descarga en función de su cinética de reciclamiento y determinación de porcentajes relativos (Bartolome-Martin *et al.* 2012).

8) En aquellos casos en los que fue necesario, se midió la densidad de botones sinápticos. Para ello se midió la longitud total de fibras axonales en el campo (fig 33D) utilizando el *plug-in* "Neuron J" de Image J (Meijering *et al.* 2004), y se dividió el número total de botones sinápticos entre la longitud total de axones.

Este método de análisis semi-automatizado presenta como principal ventaja la mínima intervención por parte del usuario y la definición automática de las regiones de interés (ROIs). Esto supone una ausencia de píxeles "muertos" y una mayor precisión en la determinación de los valores de fluorescencia.

### 4.3.3. Análisis de vGluT1-pHluorina

Sobre el archivo \*.tiff de partida se realizó una sustracción del fondo con el *plug-in* ROI > BG Subtraction from ROI, seleccionando una región libre de células con un fondo de fluorescencia mínimo.

Para la generación de la máscara con los ROIs a analizar se empleó la Macro "SARFIA" de IgroPro (Dorostkar *et al.* 2010). Este procedimiento permite identificar de forma automatizada regiones que experimenten un incremento de fluorescencia durante el tiempo de perfusión de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (fig 34A). Dicha selección por tanto es independiente de la respuesta que estos botones muestren durante la estimulación.

Se recomienda fijar un tamaño mínimo de partícula de 8 píxeles a fin de evitar la aparición de píxeles muertos (fig 34B).

# Materiales y Métodos

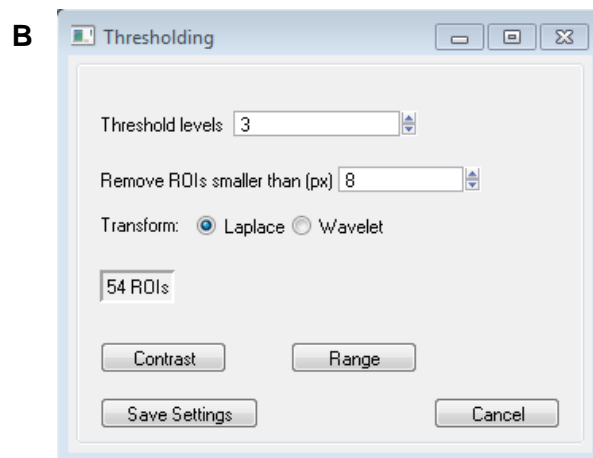
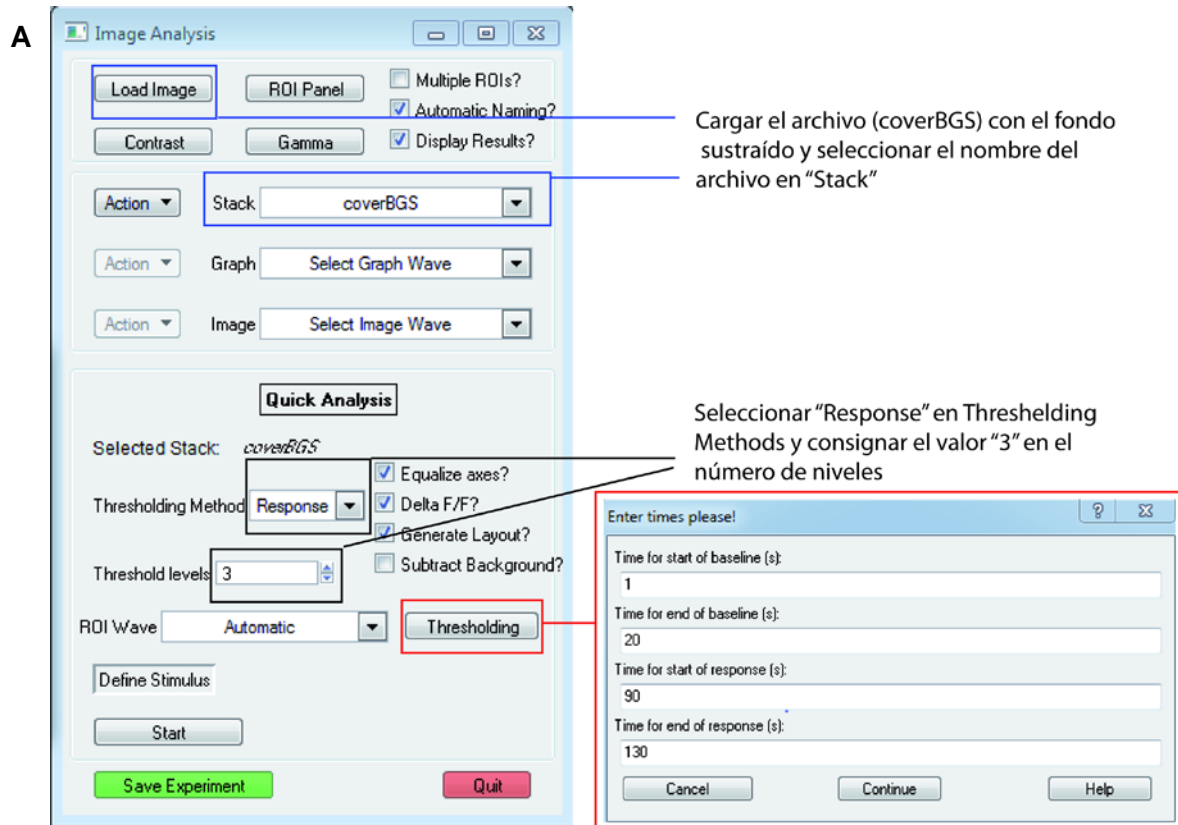


Figura 34: Consola de la Macro "SARFIA" en IgorPro con la configuración de parámetros para la creación de la máscara con los ROIs (A). Cuadro de diálogo para definir el tamaño mínimo de ROIs y el tipo de transformación a realizar (B).

## Materiales y Métodos

Una vez generada la máscara se accede a Data > Browse Waves > MITROIWave y se guarda una copia. En Image J se accede a File > Import > Raw > MITROIWave y se importa en **64-bit Real** (fig 35).

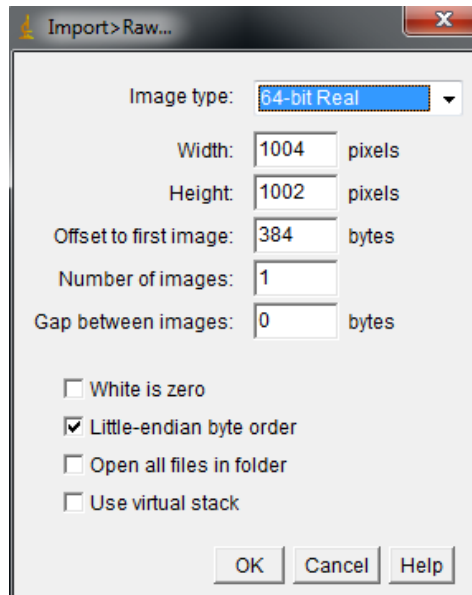


Figura 35: Cuadro de diálogo con las opciones a consignar para importar la máscara.

A continuación, con la máscara dibujada, se ajusta el umbral de índice de calidad deseado (Ctrl + Mayús + T), seleccionando todo el rango a excepción del último punto > Apply > Analyze Particles y se guarda el RoiSet.zip generado accediendo a More > Save del menú.

Una vez obtenido el RoiSet se aplica sobre la imagen de partida con el fondo sustraído y se accede a More > Multi measure para obtener los valores de fluorescencia arbitrarios (u.f.a.). Estos datos se copian en una hoja de Origin Pro y se trasladan a Microsoft Excel donde se trabajará en los sucesivos pasos.

A continuación se sustrae a cada ROI el valor de la línea base, restando para ello a cada valor la media de los diez primeros valores de fluorescencia. De este modo se confiere a la línea base un valor próximo a 0. Posteriormente se normalizan los valores de fluorescencia a los máximos obtenidos tras la perfusión de NH<sub>4</sub>Cl, de tal modo que

## Materiales y Métodos

los valores resultantes quedan comprendidos entre 0 y 1. Gracias a esta transformación matemática es posible medir la magnitud de la respuesta excitotónica como una fracción del total de vesículas de forma independiente al número de vesículas que integren el botón sináptico.

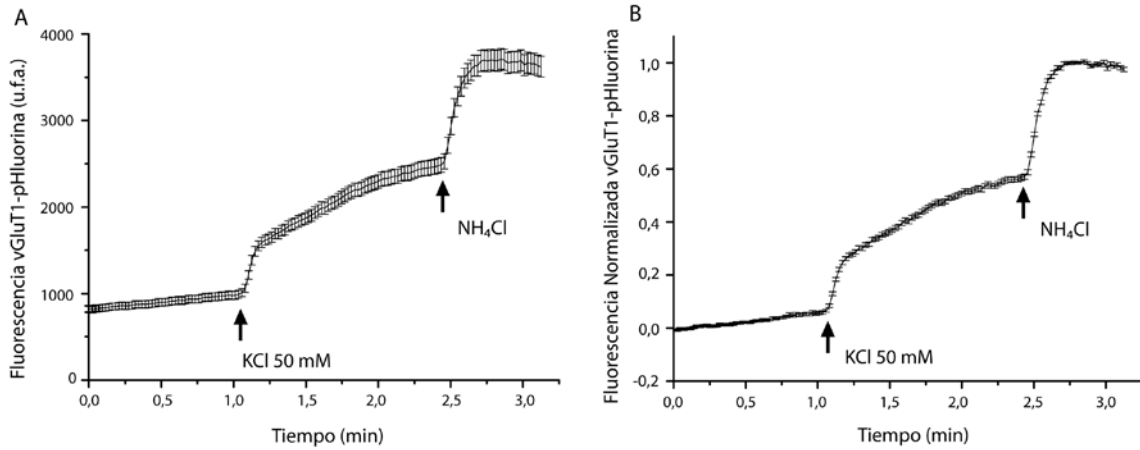


Figura 36: Perfil cinético de fluorescencia de neuronas granulares transfectadas con vGluT1-pHluorina. Mediante flechas se indica el inicio de perfusión de KCl 50 mM y NH<sub>4</sub>Cl 50 mM. A) Cinética con valores de fluorescencia cruda. B) Cinética normalizada tras ajustar la línea base a 0.

Una vez obtenidos estos valores se trasladan de nuevo a Origin Pro donde pueden ser representados (fig 36).

En los experimentos de vGluT1-pHluorina en los cuales se monitorizó dos veces el mismo campo (registros en ausencia y en presencia de Bafilomicina A1) se empleó la máscara generada durante la primera de las adquisiciones (en ausencia de Bafilomicina A1) para ambos archivos.

### 4.3.4. Análisis de imágenes de microscopía electrónica de transmisión

Para el análisis de imagen de microscopía electrónica se empleó el software Image J. Las micrografías a analizar se ajustaron con la escala pertinente para la conversión de píxeles en nm. En los estudios llevados a cabo se empleó la escala 0,72 pixel/nm para

## Materiales y Métodos

las imágenes tomadas a 80.000 aumentos. En dichas imágenes se analizaron los diámetros vesiculares y/o endosomas, longitud de la zona activa, densidad de vesículas sinápticas y endosomas por unidad de superficie y distancias de los mismos a la zona activa.

En los estudios de ultra-estructura de secciones de corteza de cerebro de ratón se analizaron además imágenes tomadas a 25.000 aumentos de los genotipos WT y FMR1 KO con el objeto de analizar posibles diferencias en el número de sinapsis en una unidad de superficie constante.

### 4.3.5. Inmunocitoquímica

En primer lugar es necesario crear una máscara que contenga las regiones de interés (ROIs) a analizar. Para ello, se procede de igual modo que en la figura 31. En este caso, y dado que únicamente se compone de una única imagen, es necesario cargar la imagen de inmunorreactividad con la sustracción del fondo ya realizada (se recomienda una sustracción del fondo mediante el algoritmo de la bola rodante con un radio de 5 pixel), y ajustar los parámetros "Baseline Starts at 1" "Ends at 1".

Se importa la máscara creada con Image J tal y como se ha descrito anteriormente (fig 32) y ésta se aplica sobre las imágenes con inmunorreactividad que se desea analizar, obteniéndose así los valores de fluorescencia arbitrarios. Los datos se trasladan a una hoja de Origin Pro para su análisis y representación.

### 4.3.6. Estadística, ajustes, programas informáticos y maquetación de imágenes

Adquisición de imagen:

- Microscopía óptica: Andor IQ 1.9.1.
- Microscopía electrónica: Programa AnalySIS 5.0, de Olympus-SIS.

Tratamiento de imágenes: Image J (*plug-in* Neuron J para las medidas de longitud total de axones), Adobe Photoshop CS3, Procesamiento de experimentos de FM1-43: IgorPro 6.31 con Macro *Bach Image Process*.

## Materiales y Métodos

Ajuste lineal de cinéticas:  $y=a+bx$ ; Ajuste de decaimiento biexponencial negativo de primer orden:  $y=y_0+Ae^{-x/\tau_1} + Ae^{-x/\tau_2}$ . En Origin Pro 8.0.

Comparaciones estadísticas de valores numéricos cuyo rango se ajusta a una distribución normal: prueba de t-Student para comparaciones duales independientes y ANOVA para comparaciones múltiples independientes. Cuando p-valor ANOVA  $<0,05$ , se usaron las pruebas de Bonferroni y Holm-Sidak para comparaciones múltiples independientes y comparaciones múltiples con respecto al control respectivamente. Sigma Plot 11.0.

Pruebas no paramétricas empleados para los datos que no se ajustan a una distribución normal: Kolmogorov-Smirnov y U de Mann-Whitney (comparaciones duales), Kruskal-Wallis (comparaciones múltiples independientes) seguido de la prueba de Dunn's para comparaciones multiples: Statgraphics Centurion XVI.I y Sigma Plot 11.0.

Distribuciones de probabilidad acumulada: Sigma Plot 11.0.

Gráficos de dispersión de puntos: GraphPad Prism 6.0.

Ilustración y maquetación de imagen: Adobe Illustrator CS3.



## V-Resultados

---

*"Por más que la naturaleza empiece por la razón y termine en la experiencia, nosotros debemos seguir la marcha contraria; es decir, empezar por la experiencia y con ella investigar la razón."*

Leonardo Da Vinci



# Resultados

## V-RESULTADOS

### **5.1. La movilización de las vesículas con capacidad de reciclamiento en las neuronas granulares de cerebelo de rata requiere un estímulo intenso**

#### **5.1.1. La estimulación química libera una mayor proporción de vesículas marcadas con FM1-43 y aumenta la proporción de botones con un reciclamiento más eficiente**

*In-vivo* las neuronas granulares del cerebelo están sometidas a condiciones de estimulación muy intensas, ya que las fibras musgosas presentan frecuencias de disparo de hasta 200 Hz (van Kan *et al.* 1993). Con objeto de seleccionar unas condiciones de estimulación intensas que garanticen una movilización vesicular máxima, se evaluó el efecto de diferentes protocolos de estimulación sobre la liberación vesicular por neuronas granulares de cerebelo de rata previamente marcadas con la sonda FM1-43. A tal efecto, se seleccionaron 3 condiciones de estimulación diferentes para evocar la exocitosis: (I) 2 trenes consecutivos de 900 potenciales de acción a 20Hz; (II) 2 trenes consecutivos de 900 potenciales de acción a 40 Hz y (III) perfusión de KCl 50 mM durante 3 minutos. En las condiciones de estimulación eléctrica (I y II), con posterioridad a ésta, se perfundió KCl 50 mM, transcurridos 30 segundos tras el cese del estímulo, con el objetivo de ver si una estimulación química de mayor intensidad era capaz de incrementar la magnitud de la respuesta exocitótica. Los efectos de dichas condiciones de estimulación quedan reflejados en la figura 37A, donde se observa que el protocolo I (2x900 AP 20 Hz) produce un apagamiento de FM1-43 progresivo y lineal. El protocolo II (2x900 AP 40Hz) desencadena una liberación más rápida, aunque iguala al anterior en porcentaje de descarga. La perfusión de KCl 50 mM en ambos protocolos (I y II) fue capaz de aumentar aún más la liberación vesicular, como así lo demostró la estimulación directa con KCl 50 mM durante 3 min, que produjo una liberación más rápida y de mayor magnitud (51%).

Por otro lado, se analizaron otros dos parámetros relacionados con la eficacia de reciclamiento: porcentaje de botones de reciclamiento eficaz o de descarga fuerte (Bartolome-Martin *et al.* 2012) y el porcentaje medio de botones funcionales presentes en el campo (fig 37B), entendiéndose como tales aquellos que muestran un

## Resultados

apagamiento de fluorescencia compatible con el de una respuesta excitotóxica (apartado 4.3.2. materiales y métodos). Con respecto al primero de los parámetros, se observaron valores de porcentaje de botones de descarga fuerte notablemente inferiores con los estímulos eléctricos respecto a los obtenidos mediante perfusión con KCl 50mM ( 2x900 AP 20 Hz:  $3,51 \pm 1,58\%$ ,  $p < 0,001$  vs KCl 50 mM; 2x900 AP 40 Hz:  $13,19 \pm 3,43\%$ ,  $p = 0,002$ ; KCl 50 mM:  $31,71\% \pm 3,73\%$ , ANOVA con comparación de Bonferroni). Atendiendo al porcentaje de botones funcionales, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre la estimulación de 4x900 AP 40 Hz y la estimulación química se observó una reducción significativa cuando la estimulación fue de 2x900 AP 20 Hz en relación a la estimulación con KCl 50 mM (2x900 AP 20Hz:  $52,11 \pm 4,86\%$ ,  $p = 0,043$  vs KCl 50 mM; 2x900 AP 40 Hz:  $58,36 \pm 2,40\%$ ,  $p = 0,338$  vs KCl 50 mM; KCl 50 mM:  $72,79 \pm 6,31\%$ , ANOVA con comparación de Bonferroni).

Estos resultados confirman que es necesaria una estimulación de gran intensidad, como en el presente caso es KCl 50 mM, para movilizar la totalidad del subconjunto de vesículas con capacidad de reciclaje (*recycling pool*).

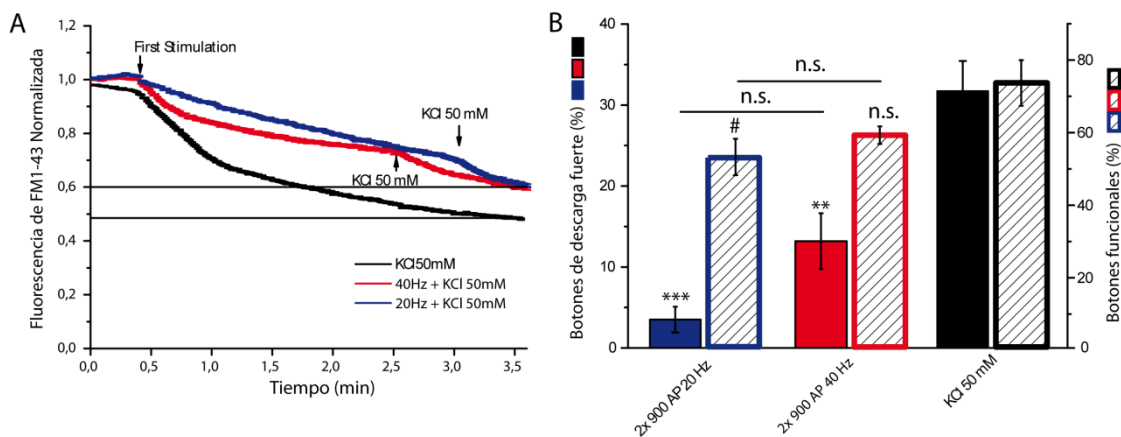


Figura 37: A) Cinéticas de descarga de FM1-43 (media  $\pm$  SEM de los registros individuales) tras estimular con 2 trenes de 900 AP a 20Hz (N=773) y posteriormente KCl 50 mM, 2 trenes de 900 AP a 40 Hz (N=904) y posteriormente KCl 50 mM y perfusión directa de KCl 50 mM 3 min (N=2309). B) Gráfico de doble entrada para el porcentaje de botones de descarga fuerte (eje izquierdo, columnas coloreadas) y porcentaje de botones funcionales (eje derecho, columnas rayadas). Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM de 2x900 AP 20 Hz (n=8), 2x900 AP 40 Hz (n=4) y KCl 50 mM (n=4). Se aplicó el test ANOVA con comparación de Bonferroni.

## Resultados

### **5.2. Los mecanismos endocitóticos sensibles a Brefeldina A (BFA) contribuyen al reciclamiento vesicular en neuronas granulares de cerebelo de rata**

#### **5.2.1. El tratamiento con BFA previo a la carga de FM1-43 reduce la densidad de botones funcionales y entorpece el reciclamiento vesicular**

Para estudiar la implicación de los complejos adaptadores AP-1 y AP-3 en el reciclamiento vesicular de neuronas granulares de cerebelo, se empleó el metabolito fúngico BFA, a una concentración 10  $\mu\text{g/ml}$ . Dicho compuesto actúa como un inhibidor del factor intercambiador de nucleótidos de guanina de la GTPasa monomérica ARF1, implicada en el reclutamiento a la membrana de los complejos adaptadores AP-1 y AP-3 (Polo-Parada *et al.* 2001). Para abordar estos estudios, se empleó el protocolo de FM1-43 descrito en materiales y métodos e ilustrado en la figura 38A, incubándose las células con BFA 10  $\mu\text{g/ml}$  en HBM de reposo durante los 30 minutos previos a la carga de la sonda.

Los valores de fluorescencia inicial, medidos al inicio del periodo monitorizado, fueron inferiores en las células tratadas con BFA que en las células no tratadas (fig 38C y 38D) en ambas poblaciones de botones, de descarga débil y descarga fuerte (grupo descarga débil; control:  $1824 \pm 24$  u.a.; BFA:  $1424 \pm 26$  u.a.,  $p < 0,001$ , Kruskal Wallis con prueba de Dunn's; grupo de descarga fuerte, control:  $1522 \pm 17$  u.a.; BFA:  $1376 \pm 21$  u.a.,  $p < 0,001$ , Kruskal Wallis con prueba de Dunn's).

Las diferencias en los valores de fluorescencia inicial no se acompañaron de cambios en las cinéticas de liberación de FM1-43 en la población de botones de descarga fuerte, y la cinética de liberación en presencia de BFA fue prácticamente superponible a la del control (fig 38E; tabla 5). Sin embargo, si se observó un enlentecimiento en la cinética de liberación en la población de botones de descarga débil en presencia de BFA (fig 38E; tabla 5).

## Resultados

Tabla 5: Efecto del tratamiento con Brefeldina A (10 µg/ml) previo a la carga de FM1-43 sobre las constantes temporales de decaimiento exponencial ( $\tau_1$ y $\tau_2$ ) y la fluorescencia neta liberada en ambos tipos de botones.						
	Descarga fuerte			Descarga débil		
	Control	BFA	p valor (t-test)	Control	BFA	p valor (t-test)
$\tau_1$ (s)	6,87 ± 0,37	6,91±0,63	p=0,906	13,09 ± 1,1	25,26 ± 4,68	p=0,022
Liberado F1 (u.a.)	486	420		326	246	
$\tau_2$ (s)	52,32 ± 0,86	49,47±0,95	p=0,068	78,07±1,58	90,62 ± 2,37	p=0,005
Liberado F2 (u.a.)	431	404		367	351	

Los datos se ajustaron a una cinética de caída biexponencial:  $y=y_0+A1e^{-x/\tau_1} + A2 e^{-x/\tau_2}$ .

El porcentaje de botones en cada grupo de respuesta no se modificó por la presencia de BFA (fig 38G; descarga fuerte, control: 52,31 ± 2,92; BFA: 48,83 ± 2,44, p=1,0 ANOVA). Sin embargo, la cuantificación de la densidad de botones funcionales ( $n^{\circ}$  de botones funcionales/longitud total de fibra axónica) si mostró una clara reducción de dicho parámetro como resultado de la incubación previa de las células con BFA (fig 38F; control: 0,049 ± 0,005, n=4; BFA: 0,025 ± 0,001, p=0,003 ANOVA con Bonferroni), sugiriendo que el reciclamiento vesicular, al menos en una subpoblación de botones, es absolutamente dependiente de los complejos AP-1/AP-3. La presencia de los complejos adaptadores AP-2 y AP-3 fue constatada en extractos de células granulares de cerebelo de 7 DIV mediante inmunodetección de proteínas en

## Resultados

membrana empleando anticuerpos frente a  $\alpha$ -adaptina y AP3 $\beta$ 2 respectivamente (fig 38H).

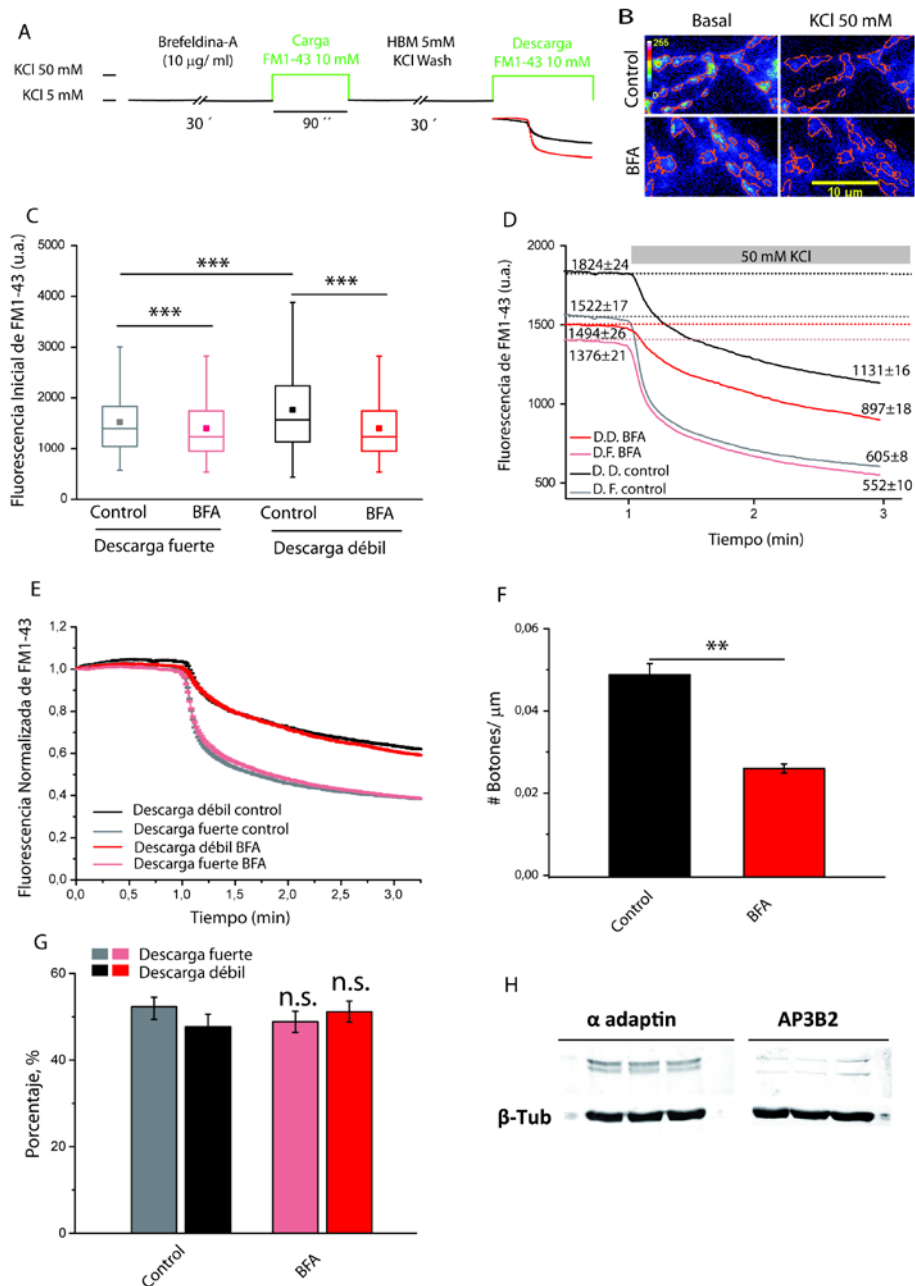


Figura 38: La incubación con BFA previa a la carga de FM1-43 interfiere con el reciclamiento de membrana. A) Protocolo experimental: las células se incubaron con BFA 10  $\mu$ g/ml durante 30 minutos previos a la carga de FM1-43. B) Imágenes con escala pseudo-color representativas de la intensidad de fluorescencia de FM1-43 antes de la estimulación y 3 minutos después del inicio del estímulo para las dos condiciones experimentales (control y tratadas con BFA). En rojo se muestran los ROIs analizados. C) Diagrama de cajas y bigotes

## Resultados

para la intensidad de fluorescencia inicial de los botones individuales sin (control) y con tratamiento de BFA en los dos grupos de calidad de respuesta. Grupo de descarga fuerte: control N=1388, n=4; BFA N=722, n=4. Grupo de descarga débil: control N=1230, n=4; BFA N=804, n=4. D) Cinéticas de descarga de FM1-43 para los botones pertenecientes al grupo de descarga fuerte y grupo de descarga débil tanto en condiciones control como tratadas con BFA. Se muestran los valores de fluorescencia de FM1-43 como la media de los registros individuales, indicándose los valores de fluorescencia inicial (previa a la estimulación) y remanente (tras la estimulación) en cada condición. E) Cinéticas de descarga de FM1-43 (media  $\pm$  SEM de los registros individuales) normalizadas al valor de fluorescencia inicial para los botones pertenecientes al grupo de descarga fuerte y débil en las dos condiciones experimentales. F) Densidad de botones funcionales, expresado como la media  $\pm$  SEM, n=4 en cada condición, p=0,003, prueba t de Student. G) Distribución porcentual de los botones en los dos grupos de calidad de respuesta expresada como media  $\pm$  SEM de los experimentos individuales (n=4 en cada condición). H) Western blot mostrando la presencia de AP2 ( $\alpha$ -adaptina; izquierda) y AP3 (AP3 $\beta$ 2; derecha) utilizando  $\beta$ -tubulina como control de carga en extractos de proteína de células granulares de cerebelo de 7 DIV (experimento representativo).

### **5.2.2. El tratamiento con BFA previo a una estimulación intensa y duradera incrementa la presencia de estructuras endosomales**

Tal y como se muestra en el apartado anterior, el tratamiento con BFA redujo significativamente los botones funcionales y afectó de manera más significativa a los botones de descarga débil. Trabajos anteriores del grupo (Bartolome-Martin *et al.* 2012, Collado-Alsina *et al.* 2014) habían puesto de manifiesto la presencia de endosomas, y un aumento muy significativo de los mismos después de una estimulación intensa, en las sinapsis. Puesto que en muchas de esas sinapsis los endosomas seguían observándose y eran abundantes 10 minutos después de la estimulación, se atribuyó a la presencia de los mismos la existencia de botones con reciclamiento ineficiente, que se manifiesta con descarga débil en los experimentos de FM1-43. Con el objetivo de tener una evidencia ultraestructural del efecto de BFA sobre el reciclamiento vesicular se llevaron a cabo estudios de microscopía electrónica emulando las condiciones ensayadas en célula viva, descritas en el apartado anterior, incluyendo la peroxidasa de rábano en el medio de estimulación para marcar los endosomas de forma selectiva. Para ello, se incubaron las preparaciones con BFA 10  $\mu$ g/ml durante 30 minutos y, a continuación, se estimularon durante 90 segundos con KCl 50 mM en presencia de peroxidasa de rábano (apartado 4.2.4.3. de materiales y

## Resultados

métodos). Tras el revelado con 3,3'-diaminobencidina, las células se fijaron a dos tiempos diferentes tras la estimulación: inmediatamente (0 min) y tras 30 minutos de reposo (30 min). Estas condiciones fueron comparadas entre sí y con respecto las condiciones basales (en ausencia de estimulación).

El análisis de las micrográficas electrónicas reveló un notable aumento de estructuras tipo endosoma (expresado como el cociente endosoma/V<sub>S</sub>) como resultado de la estimulación y fijación inmediatamente después, tanto en condiciones control como en las tratadas con BFA (fig 39A,B).

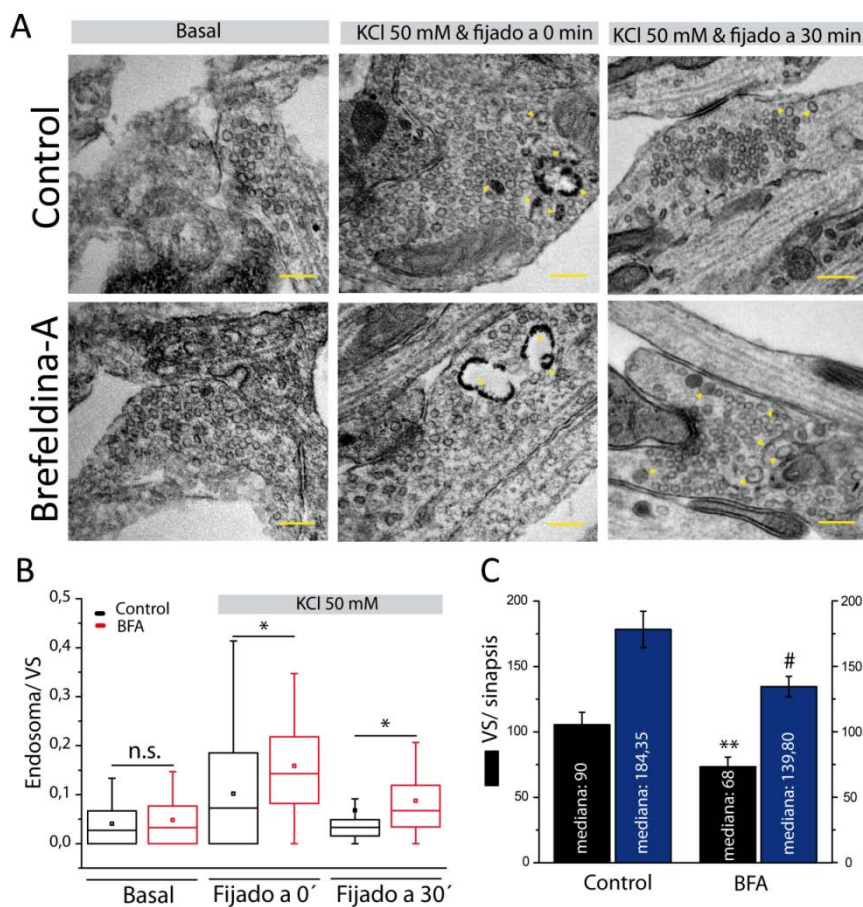


Figura 39: La adición de Brefeldina A previa a una estimulación intensa y duradera incrementa la presencia de endosomas en los terminales sinápticos. Las células se estimularon (50 mM KCl 90 segundos en presencia o ausencia de HRP 10 μg/ml) y después se fijaron inmediatamente o tras 30' de reposo. A) Micrográficas de células granulares de cerebelo en condiciones control (paneles superiores) o tratadas con BFA (paneles inferiores), mantenidas

## Resultados

en reposo (izquierda) o estimuladas y fijadas a 0 min (paneles centrales) y 30 min (paneles derechos). Barra de escala: 200 nm. Las puntas de flecha amarillas muestran endosomas de diferente tamaño. B) Diagrama de cajas y bigotes para la relación endosoma/Vs en reposo (control n=30; BFA-pre n=30, p=0,876, prueba de Mann-Whitney), estimuladas y fijadas inmediatamente (control n=36; BFA-pre n=31, p=0,014, prueba de Mann-Whitney) y estimuladas y fijadas tras 30 minutos de reposo (control n=22; BFA-pre n=24, p=0,026, prueba de Mann-Whitney). C) Gráfico de doble eje para el total de vesículas por sinapsis (eje izquierdo) y por unidad de superficie (eje derecho) para la condición de estimuladas y fijadas 30' después. Se representan los valores medios  $\pm$  SEM para el control (n=22) y tratadas con BFA (n=24), p=0,009 y p=0,019 para la densidad de Vs/sinapsis y por unidad de superficie respectivamente, prueba de Mann-Whitney.

El incremento fue significativamente mayor en las células que habían sido tratadas con BFA, y persistía aún cuando habían transcurrido 30 minutos entre la estimulación y la fijación (basal; control:  $0,04 \pm 0,0081$ ; BFA:  $0,048 \pm 0,01$ , p=0,876, prueba de Mann-Whitney; estimuladas y fijadas inmediatamente; control:  $0,102 \pm 0,019$ , n=35; BFA:  $0,158 \pm 0,019$ , n=31, p=0,014, prueba de Mann-Whitney; estimuladas y fijadas a 30 min; control:  $0,067 \pm 0,022$ , n=22; BFA:  $0,087 \pm 0,015$ , p=0,026, prueba de Mann-Whitney; fig 39B). En paralelo, se cuantificó la densidad de vesículas por sinapsis y por unidad de superficie en las preparaciones estimuladas y fijadas a los 30 minutos (fig 39C), encontrándose para ambos parámetros una clara disminución como resultado de la incubación previa con BFA (control:  $103,04 \pm 9,18$  y  $174,16 \pm 13,68$  Vs por sinapsis y  $\mu\text{m}^2$  respectivamente; BFA:  $71,68 \pm 7,15$  y  $131,42 \pm 7,60$  Vs por sinapsis y  $\mu\text{m}^2$  respectivamente, p=0,009 y p=0,019 para la densidad de vesículas por sinapsis y por unidad de superficie respectivamente, prueba de Mann-Whitney).

Estos resultados evidencian la implicación de los complejos adaptadores AP-1 y AP-3 en el reciclamiento vesicular tras una estimulación intensa y prolongada. La inhibición de los mismos afecta, fundamentalmente, al proceso de gemación de vesículas a partir de los endosomas formados, ya que en los terminales tratados con BFA se observa un mayor incremento de los endosomas y una mayor persistencia de los mismos en detrimento de las vesículas. El procesamiento de estas estructuras endosomales es rápido, observándose vesículas marcadas en la preparación estimulada y fijada inmediatamente en ausencia de BFA.

## Resultados

### 5.2.3. El tratamiento con BFA después de la carga aumenta la densidad de botones funcionales y la velocidad de liberación

Para estudiar el efecto que dicho tratamiento pudiera tener sobre la descarga de la sonda (movilización vesicular y el componente exocitótico del ciclo vesicular), las células se incubaron durante 30 minutos con BFA (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Iniciándose el tratamiento después de 5 minutos de reposo una vez finalizada la carga de FM1-43 (fig 40A). En estas condiciones, los valores de fluorescencia medidos al inicio del periodo monitorizado fueron significativamente mayores en aquellos botones incubados con BFA (fig 40B-D), tanto en los botones pertenecientes al grupo de descarga fuerte (control:  $1522 \pm 17$  u.a.; BFA:  $1660 \pm 25$  u.a.,  $p < 0,001$  Kruskal-Wallis) como en los pertenecientes al grupo de descarga débil (control:  $1824 \pm 24$  u.a.; BFA:  $2347 \pm 39$  u.a.,  $p < 0,001$ , prueba de Kruskal-Wallis).

Como resultado de la incubación con BFA, en la población de botones de descarga débil se observó un aumento de la velocidad de liberación de la sonda, así como de la cantidad de sonda liberada. El aumento de la velocidad se tradujo tanto en una disminución de las constantes temporales rápida y lenta ( $\tau_1$  y  $\tau_2$ ) como en un aumento de la fluorescencia neta liberada por ambas componentes (18% y 28% para las componentes lenta y rápida respectivamente; fig 40D y tabla 6).

La cuantificación de la densidad de botones funcionales reveló un aumento significativo de este parámetro como resultado del tratamiento con BFA (fig 40F; control:  $0,049 \pm 0,005$ ; BFA:  $0,065 \pm 0,002$ ,  $p = 0,003$ , prueba de t de Student). Sin embargo, estos resultados no se vieron acompañados de cambios significativos en el porcentaje de botones pertenecientes a los grupos de descarga fuerte y débil (fig 40G; grupo de descarga fuerte control:  $52,31 \pm 2,92\%$ ; grupo de descarga fuerte BFA:  $61,36 \pm 7,04\%$ ,  $p = 0,599$ , ANOVA con Bonferroni).

## Resultados

Tabla 6: Efecto del tratamiento con BFA (10 $\mu\text{g/ml}$ ) tras la carga de FM1-43 sobre las constantes temporales de decaimiento exponencial ( $\tau_1$ y $\tau_2$ ) y la fluorescencia neta liberada en ambos tipos de botones.						
	Descarga fuerte			Descarga débil		
	Control	BFA	p valor (t-test)	Control	BFA	p valor (t-test)
$\tau_1$ (s)	6,87 $\pm$ 0,37	5,76 $\pm$ 0,57	p=0,1535	13,09 $\pm$ 1,1	8,68 $\pm$ 0,27	p=0,008
Liberado F1 (u.a.)	486	594		326	417	
$\tau_2$ (s)	52,32 $\pm$ 0,86	41,15 $\pm$ 0,36	p<0,001	78,07 $\pm$ 1,58	59,22 $\pm$ 1,02	p<0,001
Liberado F2 (u.a.)	431	425		367	401	

Los datos se ajustaron a una cinética de caída biexponencial:  $y=y_0+A1e^{-x/\tau_1} + A2 e^{-x/\tau_2}$ .

# Resultados

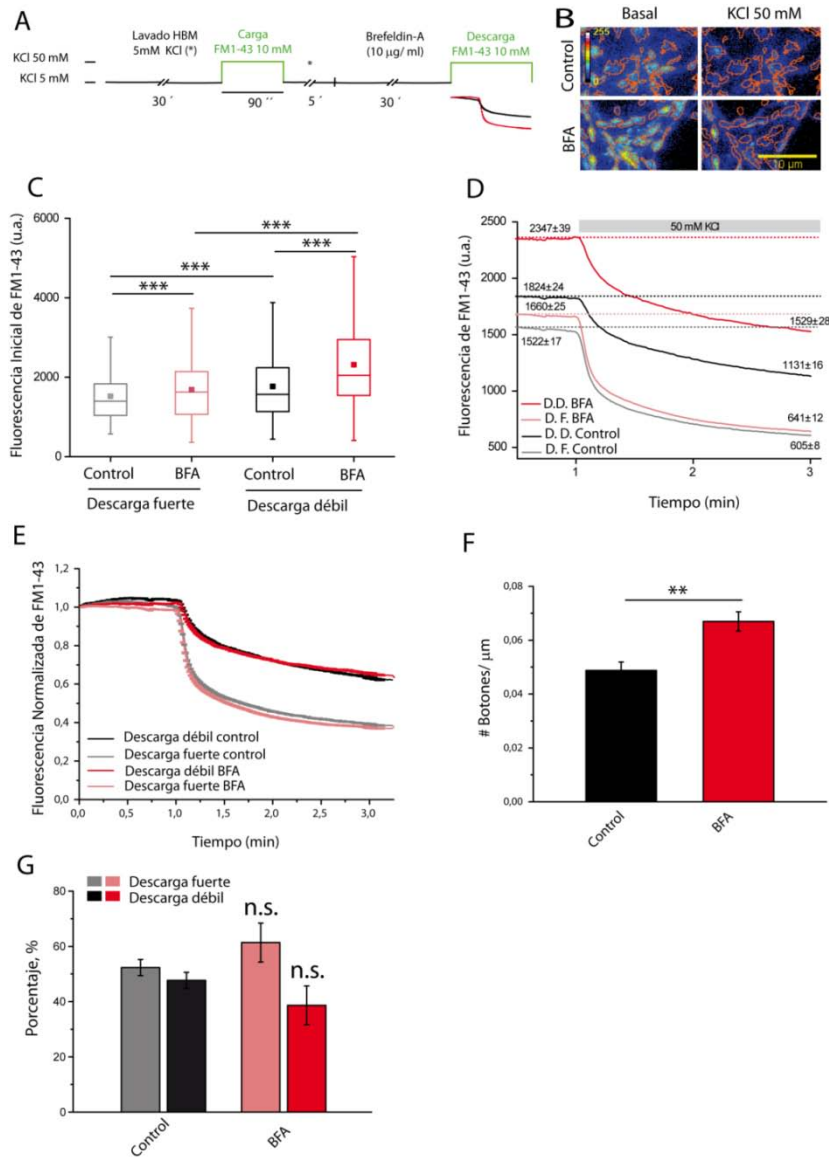


Figura 40: La inhibición de los complejos AP-1/AP-3 con BFA después de la carga de FM1-43 favorece el reciclamiento. A) Diagrama del protocolo experimental, la incubación durante 30 minutos con 10 µg/ml de BFA se inició 5 minutos después de la de carga de la sonda. B) Imágenes con escala pseudo-color representativas de la intensidad de fluorescencia de FM1-43 antes de la estimulación y 3 minutos después del inicio del estímulo para las dos condiciones experimentales. En rojo se muestran los ROIs analizados. C) Gráfico de cajas y bigotes para la intensidad de fluorescencia inicial de los botones individuales incubados sin (control) y con BFA en los dos grupos de botones. Grupo de descarga fuerte: control N=1388, n=4; BFA N=1088, n=4. Grupo de descarga débil: control N=1230, n=4; BFA N=684, n=4, p<0,001 en ambos grupos de botones. D) Cinéticas de descarga de FM1-43 para los botones pertenecientes al grupo de descarga fuerte y grupo de descarga débil tanto en condiciones

## Resultados

control como tratadas con BFA. Se muestran los valores de fluorescencia de FM1-43 como la media de los registros individuales tras la sustracción del fondo, indicándose los valores de fluorescencia inicial y remanente (previo y posterior a la estimulación) en cada condición. E) Cinéticas de descarga de FM1-43 normalizadas al valor de fluorescencia inicial para los botones de descarga fuerte y débil en las dos condiciones experimentales, se muestra la media  $\pm$  SEM de los registros individuales. F) Densidad de botones funcionales, expresado como la media  $\pm$  SEM, n=4 en cada condición, p=0,003, prueba t de Student. G) Distribución porcentual en las dos poblaciones de botones expresado como media  $\pm$  SEM de los experimentos individuales (n=4 en cada condición, p=0,599, ANOVA).

### **5.2.4. El tratamiento con BFA después de la estimulación aproxima las vesículas a la zona activa**

Los análisis de ultraestructura de neuronas incubadas con BFA durante 30 min, iniciándose dicha incubación 5 minutos después del término de la estimulación, (fig 41A,B) no mostraron alteraciones en el cociente endosoma/VS (control:  $0,067 \pm 0,034$ ; BFA:  $0,059 \pm 0,049$ , p=0,375 prueba de Mann-Whitney) ni en la densidad de vesículas sinápticas por terminal y/o unidad de superficie (fig 41C; control:  $103,04 \pm 9,18$  y  $174,16 \pm 13,60$ ; BFA:  $83,75 \pm 7,71$  y  $168,93 \pm 17,83$ , p=0,143 y p=0,409, prueba de Mann-Whitney para la densidad de vesículas por terminal y por unidad de superficie respectivamente). En las células tratadas con BFA después de la carga se observó un acercamiento neto de las vesículas sinápticas a la zona activa (fig 41D,E; datos expresados como la media  $\pm$  SEM, control:  $300,14 \pm 4,32$  nm; BFA:  $237,45 \pm 3,54$  nm, p<0,001 prueba de Kolmogorov-Smirnov). La concentración de las vesículas en las proximidades de la zona activa podría explicar esa mayor intensidad de la fluorescencia inicial observada en las células tratadas con BFA.

## Resultados

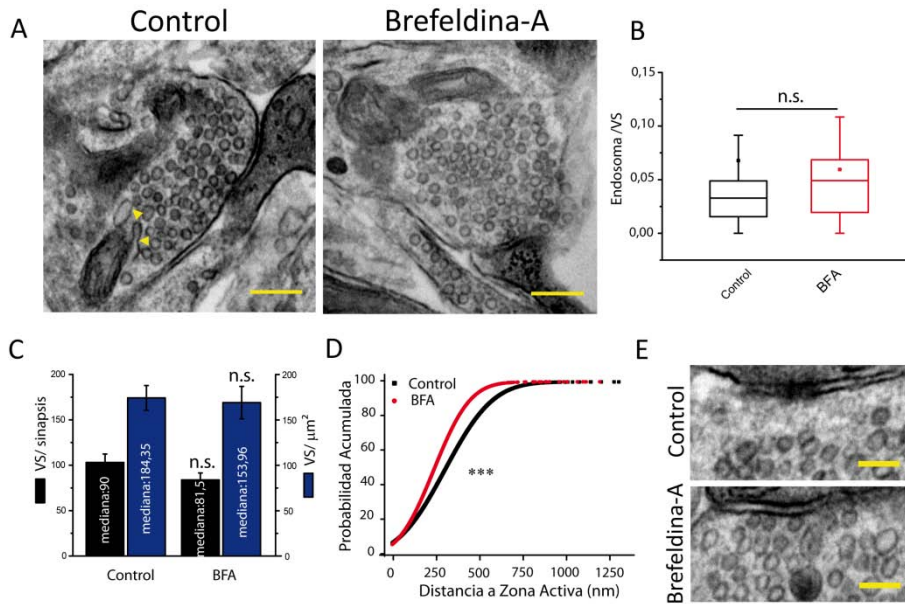


Figura 41: El tratamiento con BFA 5 minutos después de la estimulación posiciona las vesículas sinápticas más próximas a la zona activa. Las células se estimularon (50 mM KCl 90 segundos para emular el paso de carga de FM1-43 en los experimentos funcionales con FM1-43 en célula viva) y después de 5 minutos en HBM de lavado se incubaron con BFA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 30 min previos a su fijación. A) Imágenes de microscopía electrónica de células granulares de cerebelo en condiciones control (panel izquierdo) o tratadas con BFA (panel derecho). Barra de escala: 200 nm. Las cabezas de flecha amarillas señalan estructuras endosomales. B) Gráfico de cajas y bigotes para la relación endosoma/VS en condición control (n=22) y tratadas con BFA (n=24),  $p=0,375$  prueba de Mann-Whitney. C) Gráfico de doble eje para el total de vesículas sinápticas por sinapsis (eje izquierdo) y por unidad de superficie (eje derecho). Se representan las medias  $\pm$  SEM de los datos individuales para el control (n=22) y células tratadas con BFA (n=24), ( $p=0,143$  y  $p=0,409$ , prueba de Mann-Whitney para la densidad de vesículas por terminal y por unidad de superficie respectivamente). D) Gráfico de probabilidad acumulada para las distancias de las VSs y endosomas desde la zona activa en la condición control (N=2445) y tratadas con BFA (N=1984),  $p<0,001$ , prueba Kolmogorov-Smirnov. E) Imágenes de microscopía electrónica de terminales sinápticos a mayor aumento mostrando la aproximación de los orgánulos (VSs y endosomas) a la zona activa en la condición BFA-post. Barra de escala: 100 nm.

## Resultados

### 5.2.5. BFA no afecta a la velocidad de exocitosis ni de fusión espontánea durante la estimulación

Uno de los problemas que plantea el uso de FM1-43 para analizar la exocitosis es el requerimiento de una estimulación previa, para realizar la carga de la sonda, que puede condicionar la respuesta siguiente. Por tanto, con la finalidad de analizar el efecto de BFA sobre la velocidad de exocitosis durante el estímulo, se utilizó el reportero genético vGluT1-pHluorina (Voglmaier *et al.* 2006). Para ello, las neuronas granulares de cerebelo se transfectaron con el plásmido que codifica para vGluT1-pHluorina y se sometieron a un protocolo de doble estimulación en el que se introdujo bafilomicina A1, un inhibidor de la reacidificación vesicular, en el medio de perfusión entre ambos estímulos y se monitorizó la variación de fluorescencia. Durante el primer estímulo (perfusión de KCl 50 mM durante 10 segundos en ausencia de bafilomicina A1) se produce un incremento de fluorescencia debido a la exocitosis, seguido de una disminución de la misma como resultado de la endocitosis y reacidificación de las vesículas. Durante el segundo estímulo, realizado en presencia de bafilomicina A1, sólo se observa el incremento de la fluorescencia (fig 42A y sección 4.2.3.2 de materiales y métodos). Después de cada uno de los estímulos se perfundió NH<sub>4</sub>Cl para disponer así de un máximo de señal al cual relativizar la respuesta individual de cada botón (fig 42A-B). Debido a las diferencias en tamaño de los botones y a su probabilidad de liberación (Murthy *et al.* 1997, Trommershauser *et al.* 2003), se hace necesario disponer de un valor normalizado de fluorescencia para su comparación y análisis.

El tamaño del RP no se vio afectado por la incubación de las células con BFA (fig 42C; control:  $48,86 \pm 2,14\%$ ; BFA:  $41,78 \pm 2,26\%$ ,  $p=0,152$ , prueba de t de Student). Tampoco se observaron diferencias significativas en el tamaño del "pool" total vesicular (máxima fluorescencia tras la perfusión de NH<sub>4</sub>Cl).

Los cambios de fluorescencia observados en presencia de bafilomicina A1 (tras la sustracción de la liberación espontánea) muestran la exocitosis neta, mientras que los cambios en ausencia de bafilomicina A1 muestran el balance entre el componente exo- y endocitótico durante la estimulación (fig 42D). Se determinaron las velocidades de exocitosis y endocitosis durante la estimulación dado que el componente de la endocitosis puede ser estimado fácilmente sustrayendo los valores de fluorescencia obtenidos en ausencia de bafilomicina A1 a los obtenidos en su presencia (Fernandez-Alfonso & Ryan 2004, Burrone *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2014). La velocidad de

## Resultados

exocitosis durante la estimulación no se vio afectada por el tratamiento con BFA (control:  $0,028 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ ; BFA:  $0,030 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ ,  $p=0,281$ , prueba de t de Student). Sin embargo, la velocidad de endocitosis si se vio ligeramente aumentada con BFA (control:  $0,016 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ ; BFA:  $0,019 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ ,  $p=0,048$ , prueba de t de Student).

Se estudió también el efecto de BFA sobre la endocitosis después de la estimulación, no encontrándose diferencias apreciables entre las dos condiciones experimentales (control y tratada con BFA), siendo las constantes temporales de decaimiento exponencial muy similares (control:  $\tau=11,93 \pm 1,41 \text{ s}$  y BFA:  $\tau=16,74 \pm 3,20 \text{ s}$ ;  $p=0,143$ , prueba de t de Student). También se analizó la velocidad de liberación espontánea mediante la determinación de la pendiente de la línea base en presencia de bafilomicina A1, no encontrándose diferencias como resultado del tratamiento con BFA (control:  $0,0597 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ ; BFA:  $0,061 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ ,  $p=0,434$ , prueba de t de Student).

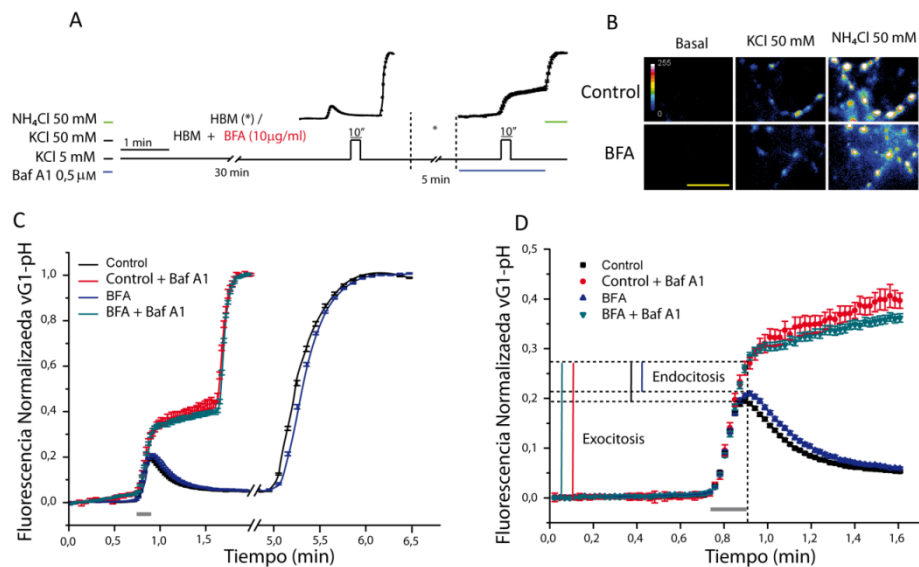


Figura 42: BFA no afecta a la velocidad de exocitosis durante la estimulación (10 segundos 50 mM KCl) ni a la velocidad de fusión espontánea de las vesículas. A) Las neuronas fueron incubadas con BFA durante 30 minutos o mantenidas en condiciones control y posteriormente fueron estimuladas con 50 mM KCl durante 10 segundos en ausencia de bafilomicina A1 seguido de la perfusión de NH<sub>4</sub>Cl 50 mM. Tras 5 minutos de reposo, las neuronas fueron

## Resultados

estimuladas de nuevo durante 10 segundos con KCl 50 mM en presencia de bafilomicina A1 y seguidamente se perfundió NH<sub>4</sub>Cl 50 mM. B) Imágenes con escala pseudo-color representativas de neuronas control y tratadas con BFA en condición basal (paneles izquierdos), tras la estimulación 50 mM KCl (paneles centrales) y tras la perfusión con NH<sub>4</sub>Cl 50 mM (paneles derechos). C) Cinéticas de la variación de fluorescencia de vGluT1-pHluorina evocado por la perfusión de KCl 50 mM (en presencia y ausencia de bafilomicina A1) normalizadas al máximo de señal fluorescente proporcionado por la subsiguiente perfusión de NH<sub>4</sub>Cl 50 mM. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM de los registros individuales (control: N=440 botones, n=5; BFA: N=327, n=5). Las cinéticas han sido superpuestas para su comparación. D) Cinética de la variación de fluorescencia de vGluT1-pHluorina evocada por la perfusión de KCl 50 mM tras la sustracción de la liberación espontánea en presencia y ausencia de bafilomicina A1. Los valores de fluorescencia han sido normalizados al máximo registrado tras la perfusión de NH<sub>4</sub>Cl 50 mM. Se muestran insertos las fracciones de exocitosis y endocitosis durante la estimulación en presencia y ausencia de bafilomicina A1.

### **5.3. Los endosomas de reciclamiento generan VSs que pueden participar en el ciclo vesicular en una segunda estimulación**

Tal y como se ha puesto de manifiesto en el apartado 5.2.2 y en trabajos previos del grupo (Bartolome-Martin *et al.* 2012, Collado-Alsina *et al.* 2014), la estimulación con KCl 50 mM promueve la liberación de múltiples vesículas, favoreciendo la endocitosis en masa y la formación de endosomas. En el apartado 5.2.2 también se ha puesto de manifiesto que estos endosomas dan lugar a nuevas vesículas mediante un procesamiento rápido de los mismos. Combinando el marcaje de vesículas y/o endosomas con la microscopía electrónica, se ha intentado explicar la existencia de botones con diferente eficiencia de reciclamiento. Para ello, se realizaron estudios de microscopía electrónica con fotoconversión (sección 4.2.4.2. de materiales y métodos) fijando la preparación inmediatamente después del cese del estímulo con KCl 50 mM (fijado 0') y se compararon los resultados obtenidos cuando la fijación tenía lugar 10 min después del cese de estímulo (fijado 10'). Adicionalmente, con el objetivo de evaluar las VSs recicladas que eran reutilizadas en una segunda estimulación de características similares, se ensayó una tercera condición en la cual, transcurridos los 10 min después de la estimulación conducente a la carga de la sonda, se estimuló de nuevo en ausencia de FM1-43<sub>FX</sub> (condición "descargado" de la figura 43). Como puede apreciarse en los paneles de la izquierda, cuando las células se estimularon y fijaron inmediatamente, en todos los botones sinápticos aparecieron vesículas electrodensas

## Resultados

pero en algunos de estos botones también se observaron estructuras endosomales de diferente tamaño, algunas de las cuales permanecían abiertas en el momento de la fijación (fig 43A; las puntas de flecha amarilla señalan los endosomas). El análisis de los resultados mostró un incremento significativo del porcentaje de orgánulos reciclados cuando la fijación tenía lugar a los 10 min, en paralelo se observa una disminución del tamaño de los endosomas, corroborando los resultados mostrados en el apartado 5.2.2. Por otra parte, el porcentaje de orgánulos reciclados volvió a disminuir cuando las células se sometieron a un segundo estímulo en ausencia de FM1-43<sub>FX</sub> (figura 43B; fijado 10':  $68,27 \pm 1,61\%$ , n=48; fijado 0':  $60,46 \pm 2,19\%$ , n=47; \* $p < 0,05$  vs fijado a 10'; descargado:  $46,87 \pm 2,10\%$ , n=45, \* $p < 0,05$  vs fijado 10'; prueba de Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$  con método de Dunn's). Sin embargo, la relación endosoma/Vs no se vio alterada en ninguna de las condiciones (figura 43C; fijado 10':  $0,025 \pm 0,005$ , n=48; fijado 0':  $0,027 \pm 0,008$ , n=47; descargado:  $0,026 \pm 0,006$ , n=45,  $p = 0,697$ , prueba de Kruskal-Wallis), aunque es muy importante observar la gran diferencia de tamaño de los endosomas que existe en las diferentes condiciones. En la imagen inferior derecha se puede observar la presencia de endosomas marcados además de vesículas marcadas, que no se han liberado y que contribuyen a la fluorescencia remanente.

Estos resultados evidencian que: (1) los endosomas formados durante la estimulación de 90s con KCl 50 mM son procesados, al menos parcialmente, dando lugar a Vs recicladas, (2) el procesamiento de los endosomas da lugar a una disminución del tamaño de los mismos, sin afectar a su número, (3) las Vs recicladas (marcadas por fotoconversión) no son exclusivas del RP dado que una estimulación de idénticas características no las moviliza en su totalidad, aunque sí con cierta preferencia.

## Resultados

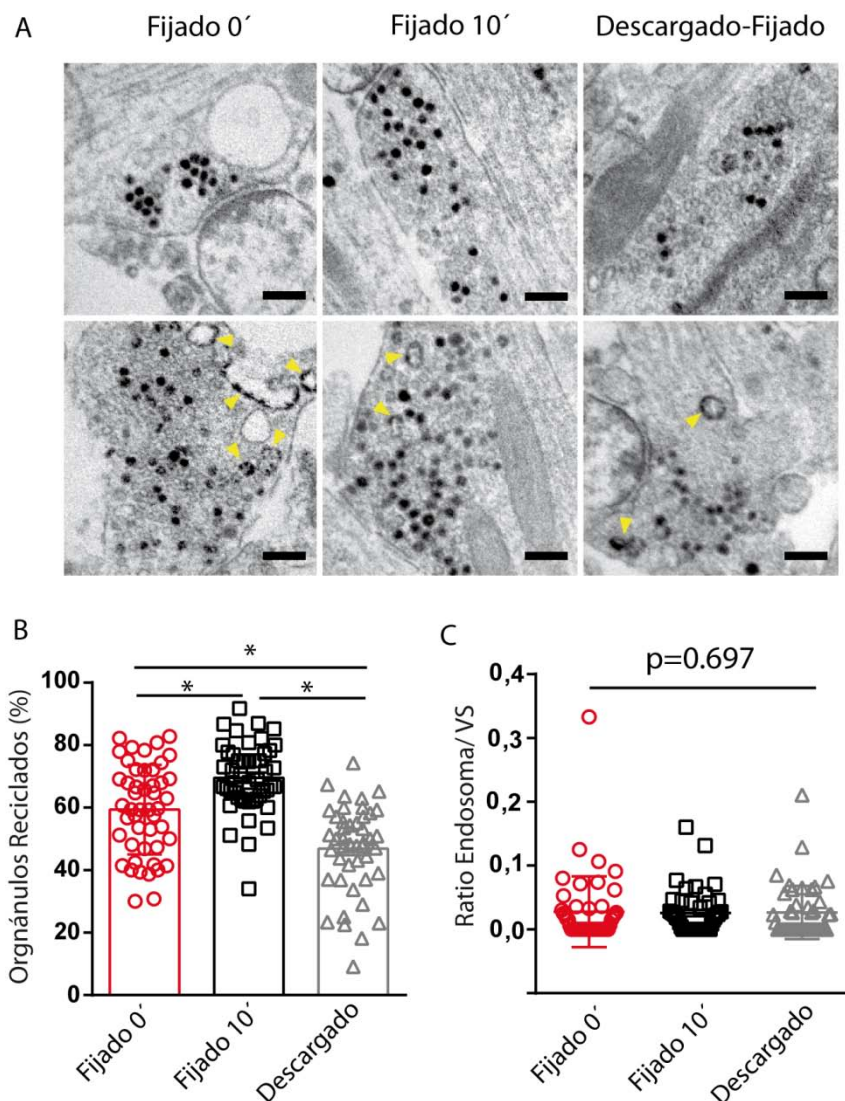


Figura 43: Los endosomas de reciclamiento generan VSs que pueden participar en el ciclo vesicular sináptico ante un segundo estímulo. A) Micrografías electrónicas de células granulares marcadas mediante fotoconversión y fijadas inmediatamente después del cese del estímulo con KCl 50 mM (paneles izquierdos), 10 min después de la estimulación (paneles centrales) y tras una segunda estimulación de 90s con KCl 50 mM 10 min después del estímulo (paneles derechos). Las puntas de flecha amarillas muestran endosomas de reciclamiento. Barra de escala 200 nm. B) Gráfico de dispersión para el porcentaje de orgánulos reciclados con la media  $\pm$  SEM (fijado 10' (n=48); fijado 0' (n=47); descargado (n=45); prueba de Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$  con método de Dunn's. "\*" muestra  $p < 0,05$  con respecto a la condición fijado a 10 min). C) Gráfico de dispersión para el cociente número de endosomas/número de VSs, con el valor medio  $\pm$  SEM (fijado 10' (n =48); fijado 0' (n =47); descargado (n=45),  $p=0,697$ , prueba de Kruskal-Wallis).

## Resultados

### 5.4 La disrupción del citoesqueleto de actina altera el reciclamiento vesicular sináptico y disminuye la densidad de sinapsis funcionales en neuronas granulares de cerebelo

#### 5.4.1. La desestabilización del citoesqueleto de actina previa a la carga de FM1-43 disminuye la intensidad de marcaje y la densidad de botones funcionales

Para abordar estos estudios, se hizo uso de dos toxinas que afectan a la polimerización del citoesqueleto de actina de forma antagónica: jasplakinolida (JSK) y latrunculina-A (LA). La primera de ellas se comporta como un agente estabilizador de los filamentos de actina, promoviendo incluso la polimerización *in-vitro*. LA, a su vez, actúa secuestrando monómeros de G-actina y desplazando, de este modo, el equilibrio actina F-actina G hacia la forma globular de la actina.

En primer lugar, se constató el efecto que dichos fármacos ejercían sobre el equilibrio de polimerización de la actina, cuantificando para ello el cociente F/G-actina tras el tratamiento con JSK (1 $\mu$ M) o LA (12  $\mu$ M) durante 20 minutos en condiciones basales o tras la estimulación de las células con KCl 50 mM durante 90s (fig 44A,B). Los resultados muestran una clara disminución del cociente F/G-actina como resultado del tratamiento con LA en ambas situaciones (basal y estimulado; n=2, p=0,01, prueba de Kruskal-Wallis) y un fuerte aumento de la polimerización de actina con JSK en basal (16,5 veces) y tras la estimulación (44 veces) (n=2, p=0,01, prueba de Kruskal-Wallis).

Posteriormente, se ensayó el efecto de dichas toxinas sobre la movilización vesicular a dos tiempos de incubación: tratamiento en agudo (20 minutos) y de larga duración (24h). Para ello, se empleó la técnica de inmunocitofluorescencia mediante el marcaje con anti-syt1 luminal descrito en materiales y métodos (sección 4.1.4.3.) y posterior marcaje con anti-Bss (fig 44C). Se observó una drástica disminución del número de botones funcionales como resultado del tratamiento previo con JSK y LA en todos los casos (fig 44C y D), ya fuese durante 20 min o 24 h (control: 73,74  $\pm$  0,70%; JSK: 57,47  $\pm$  2,74% y 54,67  $\pm$  3,58%, 20 min y 24h respectivamente; LA: 36,02  $\pm$  2,5% y 27,21  $\pm$  3,81%, 20 min y 24h respectivamente, p<0,001, ANOVA con prueba de Holm-Sidak).

En paralelo, la cuantificación de la densidad integrada de fluorescencia para syt1 (fig 44E) mostró niveles notablemente inferiores tras el tratamiento con JSK y LA (control:

## Resultados

372,88 ± 28,00 u.a.; JSK 20 min: 173,70 ± 18,79 u.a.; JSK 24h: 161,19 ± 16,50 u.a.; LA 20 min: 125,42 ± 7,23 u.a.; LA 24h: 116,61 ± 9,71 u.a.,  $p < 0,001$ , ANOVA con prueba de Holm-Sidak). Estos resultados evidencian la implicación del citoesqueleto de actina en la movilización vesicular hacia la zona activa y su participación en mecanismos de reciclaje necesarios para la incorporación del anticuerpo en el interior de las vesículas. Adicionalmente, se cuantificó la densidad integrada de fluorescencia de la proteína de andamiaje Bassoon (fig 44F), con el fin de determinar si la desestructuración del citoesqueleto de actina presináptico afectaba al anclaje y localización de dicha proteína de citomatrix. Los resultados mostraron valores de inmunorreactividad inferiores con respecto al control en todas las condiciones ensayadas, en consonancia con los valores de fluorescencia de syt1 (control: 2334,88 ± 88,60 u.a.; JSK: 1009,50 ± 41,95 u.a. y 1141,60 ± 172,56 u.a., 20 min y 24h respectivamente; LA: 1157,72 ± 119,34 u.a. y 882,14 ± 28,10 u.a., 20 min y 24h respectivamente,  $p = 0,002$ , prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's). A la luz de estos resultados, se utilizaron en lo sucesivo tiempos de incubación de 20 minutos con ambos fármacos para el resto de experimentos.

## Resultados

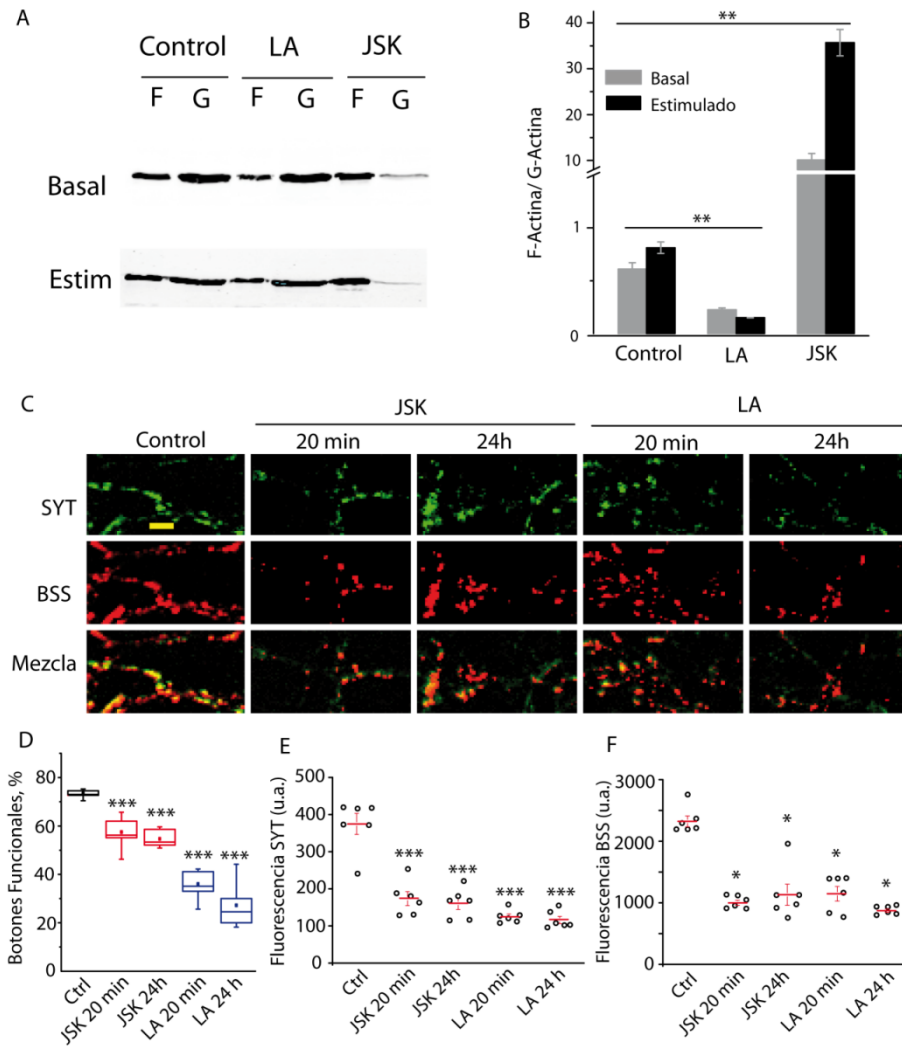


Figura 44. La disrupción de la dinámica del citoesqueleto de actina disminuye el número de botones funcionales. A) Western blot mostrando el efecto de dichos tratamientos sobre el cociente F/G-actina. B) Cuantificación del Western Blot. Se representa la media  $\pm$  SEM de dos experimentos individuales,  $p=0,01$ , prueba de Kruskal-Wallis. C) Las VSs de reciclamiento fueron marcadas mediante la incubación de las neuronas con anticuerpos frente al dominio luminal de sinaptotagmina 1 (syt1) en medio HBM de estimulación (1,33 mM  $\text{CaCl}_2$  y KCl 50 mM), y posteriormente, tras la fijación, se utilizó un anticuerpo frente a Bassoon (Bss) como marcador presináptico. Nótese los agrupamientos de Syt1 solapados con Bss. Barra de escala 5  $\mu\text{m}$ . D) Gráfico de cajas y bigotes para la cuantificación de botones funcionales ( $\text{Syt}^+$  y  $\text{Bss}^+$ ) relativizado al total de partículas  $\text{Bss}^+$ . Datos obtenidos de 30 campos ( $N=30$ ) procedentes de 6 muestras individuales ( $n=6$ ),  $p<0,001$ , ANOVA con prueba de Holm-Sidak. \*\*\* muestra diferencias significativas respecto al control ( $p<0,001$ ). E) Gráfico de dispersión para la densidad integrada de fluorescencia de syt1. La línea roja representa la media  $\pm$  SEM.  $n=6$  para cada condición,  $p<0,001$ , ANOVA con prueba de Holm-Sidak. \*\*\* ( $p<0,001$ ) muestra

## Resultados

diferencias significativas frente al control. F) Gráfico de dispersión para la densidad integrada de fluorescencia de Bss.  $n=6$  para cada condición,  $p=0,002$ , Kruskal-Wallis con prueba de Dunn's. \* ( $p<0,05$ ) muestra diferencias frente al control.

### **5.4.2. La desestabilización de la dinámica del citoesqueleto de actina previo a la carga de FM1-43 disminuye su intensidad de marcaje y la densidad de botones funcionales**

Una vez ensayado el efecto de los fármacos JSK y LA mediante inmunocitofluorescencia e inmunodetección en membrana, se procedió a evaluar el efecto que éstos tenían sobre la incorporación de la sonda FM1-43, incubando las células con JSK o LA durante 20 min previo a la carga de la sonda (90s en HBM de estimulación en presencia de  $10 \mu\text{M}$  de FM1-43; fig 45A). Las cinéticas de descarga de FM1-43 no mostraron diferencias apreciables entre las 3 condiciones en ninguna de las dos poblaciones de botones, descarga fuerte y descarga débil (fig 45C y tabla 7). Tampoco se observaron diferencias en el reparto de porcentaje de botones en ambos grupos (fig 45D; botones de descarga fuerte, control:  $59,48 \pm 2,43\%$ ; JSK:  $59,42 \pm 8,04\%$ ; LA:  $57,38 \pm 6,60\%$ ,  $p=0,963$ , ANOVA; botones de descarga débil, control:  $42,62 \pm 2,43\%$ ; JSK:  $40,58 \pm 8,04\%$ ; LA:  $42,62 \pm 6,60\%$ ,  $p=0,963$ , ANOVA).

La cuantificación de los valores de fluorescencia iniciales reveló una reducción de dicho parámetro tras los tratamientos con JSK y LA (fig 45E), tanto en la población de botones de descarga fuerte (control:  $1301,79 \pm 15,28$  u.a.; JSK:  $1193,79 \pm 29,27$  u.a.; LA:  $864,56$  u.a.,  $p<0,001$ , prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's) como de descarga débil (control:  $1825,52 \pm 31,41$  u.a.; JSK:  $1431,65 \pm 21,06$  u.a.; LA:  $1041,94 \pm 19,70$  u.a., prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's). A su vez, el tratamiento con JSK y LA se tradujo en una menor liberación de FM1-43 por los botones de descarga débil (control:  $638,42 \pm 11,10$  u.a.; JSK:  $456,13 \pm 12,79$  u.a.; LA:  $374,54 \pm 7,18$  u.a.,  $p<0,001$ , prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's) mientras que la fluorescencia liberada por los botones de descarga fuerte sólo se vio afectada por el tratamiento con LA (control:  $758,11 \pm 8,26$  u.a.; JSK:  $867,93 \pm 13,11$  u.a.; LA:  $523,19 \pm 5,06$  u.a.,  $p<0,001$ , prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's).

En consonancia con la disminución del número de botones funcionales observado mediante el marcaje con anti-syt1 (fig 44D), también se encontró una reducción de la

## Resultados

densidad de botones funcionales (número de botones funcionales por longitud de fibra axónica; fig 45E) como resultado de la incubación previa con JSK y LA en estos experimentos (control:  $0,121 \pm 0,005$ ; JSK:  $0,085 \pm 0,0015$ ; LA:  $0,089 \pm 0,001$ ,  $p=0,001$ , ANOVA seguido de prueba de Holm-Sidak).

Tabla 7: Valores de las constantes temporales de decaimiento exponencial ( $\tau$ ).									
	d.f. Ctrl	d.d. Ctrl	*p valor	d.f. JSK	d.d. JSK	*p valor	d.f. LA	d.d. LA	*p valor
$\tau_1$ (s)	$4,74 \pm 0,53$	$8,20 \pm 1,75$	0,040	$5,36 \pm 0,42$	$7,41 \pm 1,18$	0,143	$4,53 \pm 0,38$	$7,36 \pm 0,97$	0,020
$\tau_2$ (s)	$53,58 \pm 4,46$	$87,11 \pm 16,02$	0,086	$49,90 \pm 1,72$	$68,95 \pm 7,09$	0,051	$44,97 \pm 6,99$	$75,07 \pm 13,77$	0,022
% $\tau_1$	$58,051 \pm 1,72$	$40,09 \pm 3,90$	0,002	$55,27 \pm 2,44$	$31,89 \pm 3,34$ $p=0,042$	0,002	$55,35 \pm 3,54$	$31,27 \pm 2,06$ $p=0,03$	0,002

Valores de las constantes temporales de decaimiento exponencial ( $\tau$ ) para los botones de descarga fuerte (d.f.) y débil (d.d.) en los diferentes tratamientos farmacológicos obtenidas mediante ajuste de las cinéticas a un modelo exponencial negativo de segundo orden. Se representan los valores de  $\tau_1$  (rápida),  $\tau_2$  (lenta) y porcentaje (%) de la componente  $\tau_1$  en la cinética de descarga. Los p-valores muestran la comparación estadística mediante t de Student entre los grupos de descarga fuerte y débil de la misma condición. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos farmacológicos.

## Resultados

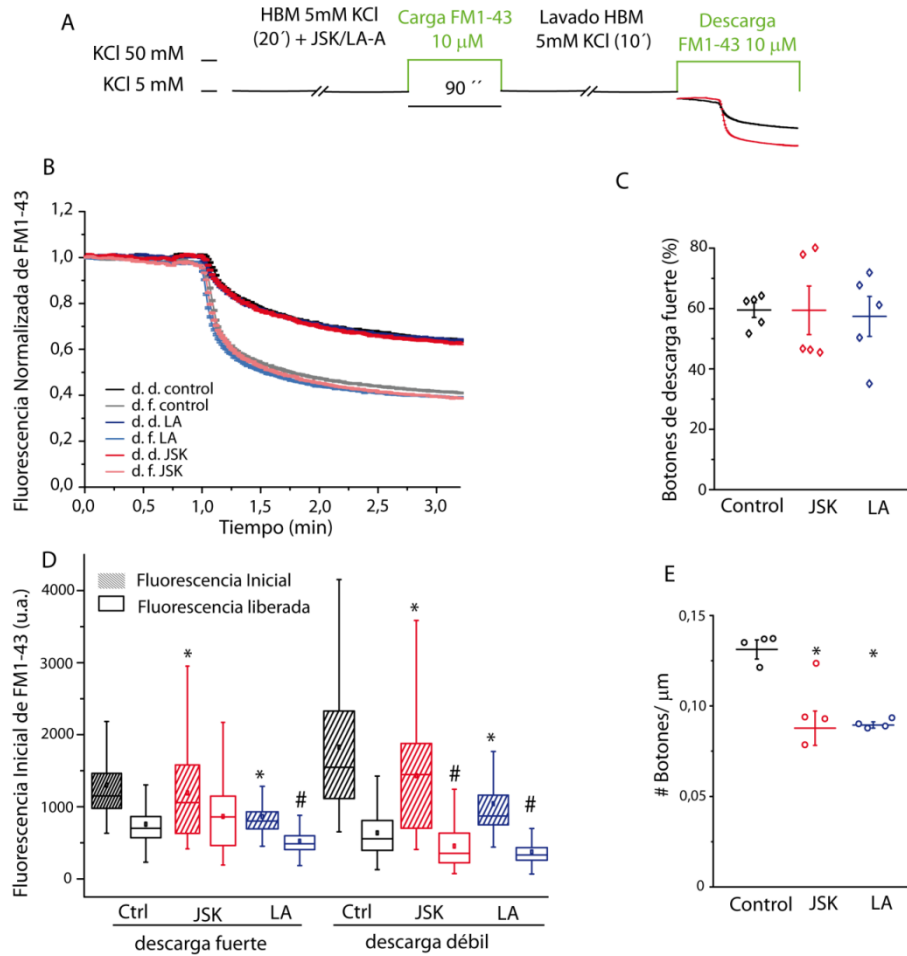


Figura 45. Efecto de la disrupción de la dinámica del citoesqueleto de actina previo a una estimulación intensa y de larga duración sobre el reciclamiento de membrana. A) Protocolo experimental: las células fueron incubadas con JSK (1  $\mu$ M) o LA (12  $\mu$ M) durante 20 minutos previos a la carga de FM1-43. B) Cinéticas medias de descarga de FM1-43 para los botones pertenecientes al grupo de descarga fuerte (d.f.) y descarga débil (d.d.) en las tres condiciones experimentales, normalizados al valor de fluorescencia inicial y expresando la media  $\pm$  SEM (grupo de descarga fuerte; control: N=1036; JSK: N=1079; LA: N=1112; grupo de descarga débil; control: N=861; JSK: N=501; LA: N=622; n=5 en todas las condiciones). C) Gráfico de dispersión para el porcentaje de botones en el grupo de descarga fuerte (diamantes vacíos) y la media  $\pm$  SEM, n=5 cada condición, p=0.963, ANOVA. D) Gráfico de cajas y bigotes para la internalización (cajas rayadas) y liberación (cajas vacías) de FM1-43 en células control o tras el tratamiento con JSK o LA. "\*" y "#" muestran diferencias significativas con respecto al control para la fluorescencia inicial (p<0,001, prueba de Kruskal-Wallis seguido de comparación con método de Dunn's en ambas poblaciones de botones) y fluorescencia liberada (p<0,001, prueba de Kruskal-Wallis seguido de método de Dunn's en ambas poblaciones de botones) respectivamente. Grupo de descarga fuerte, control: N=1036; JSK: N=1079; LA: N=1112; grupo

## Resultados

de descarga débil, control: N=861; JSK: N=501, LA: N=622. E) Gráfico de dispersión para la densidad de botones funcionales (círculos vacíos) y la media  $\pm$  SEM, n=4 cada condición, p=0,001, ANOVA seguido de prueba de Holm-Sidak, p=0,002 JSK vs control y p<0,001 LA vs control.

### 5.4.3. El análisis ultraestructural evidencia la implicación del citoesqueleto de actina en el reciclamiento vesicular sináptico

En primer lugar, con el objeto de evaluar si la disrupción del equilibrio actina F-actina G ejercía algún efecto sobre la ultraestructura de los botones sinápticos, se analizaron terminales sinápticos tratados con JSK (1  $\mu$ M) y LA (12  $\mu$ M) durante 20 min (en condiciones de reposo) mediante microscopía electrónica. Las micrografías electrónicas no mostraron alteraciones relevantes como resultado del tratamiento con cada uno de los fármacos (fig 46A). No se observaron diferencias significativas en el diámetro medio de los orgánulos (fig 46B; control 41,32  $\pm$  0,88 nm; JSK 38,70  $\pm$  0,58 nm; LA 39,59  $\pm$  1,37 nm, p=0,074, prueba de Kruskal-Wallis). El análisis de porcentaje de distribución de VSs en relación con su distancia a la zona activa (fig 46C) no mostró alteraciones en la distribución espacial de vesículas en los 50 nm más próximos a la zona activa (control: 11,95  $\pm$  1,72%; JSK: 12,45  $\pm$  2,21%; LA: 8,38  $\pm$  1,42%, p=0,190, prueba de Kruskal-Wallis). Tampoco se encontraron diferencias en la longitud de la zona activa (fig 46D; control: 417,78  $\pm$  35,97 nm; JSK: 520,38  $\pm$  54,14 nm; LA: 446,22  $\pm$  44,15 nm, p=0,252, ANOVA), superficie sináptica (fig 46E; control: 0,42  $\pm$  0,07  $\mu$ m<sup>2</sup>; JSK: 0,40  $\pm$  0,05  $\mu$ m<sup>2</sup>; LA: 0,52  $\pm$  0,07  $\mu$ m<sup>2</sup>, p=0,399, prueba de Kruskal-Wallis) o número de orgánulos por  $\mu$ m<sup>2</sup> (fig 10F; control: 182,63  $\pm$  21,22; JSK: 191,46  $\pm$  15,63; LA: 213,52  $\pm$  20,69, p=0,512, ANOVA).

# Resultados

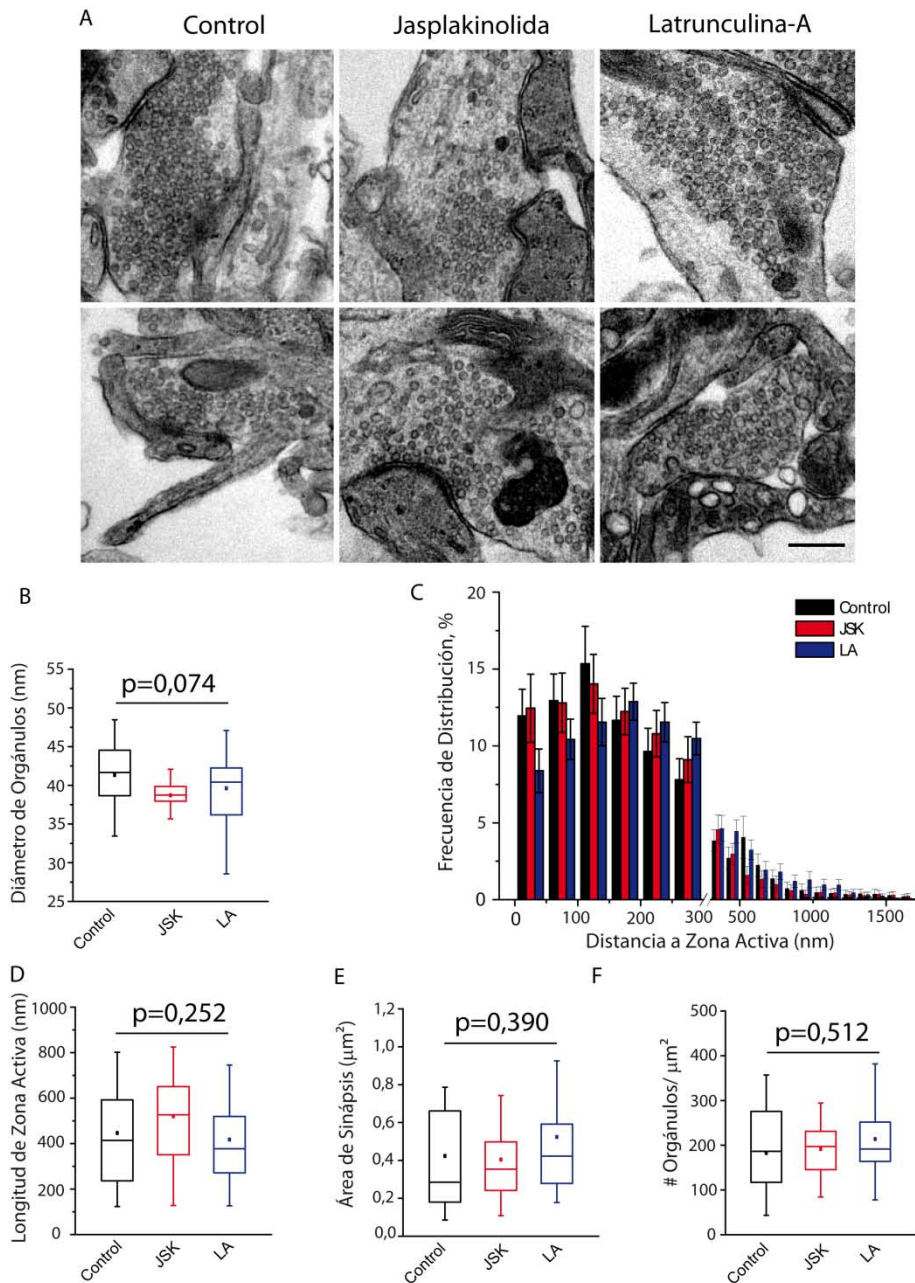


Figura 46: Morfología de los botones sinápticos en condición basal. A) Imágenes de microscopía electrónica representativas de botones sinápticos en condición control (paneles izquierdos), tratados con JSK (paneles centrales) y tratados con LA (paneles derechos). Barra de escala 200 nm. B) Gráfico de cajas y bigotes para el diámetro de los orgánulos en cada condición experimental. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM (control: n=20, N=1387; JSK: n=21, N=1226; LA: n=20, N=2186; p=0,074, prueba de Kruskal-Wallis. C) Histograma de distribución de porcentajes mostrando la distancia de VSs y endosomas a la zona activa en compartimientos de 50 nm. Control (n=20); JSK (n=21); y LA (n=20), p=0,190, prueba de Kruskal-Wallis para el compartimiento 0-50 nm. D) Gráfico de cajas y bigotes para la longitud

## Resultados

de la zona activa (en nm) en cada condición experimental, expresado como media  $\pm$  SEM. Control (n=21); JSK (n=21); LA (n=20),  $p=0,252$ , ANOVA). E) Gráfico de cajas y bigotes para el área sináptica en  $\mu\text{m}^2$ . Datos expresados como la media  $\pm$  SEM. Control (n=20); JSK (n=21); LA (n=20),  $p=0,390$ , prueba de Kruskal-Wallis). F) Gráfico de cajas y bigotes para el número de orgánulos por  $\mu\text{m}^2$ , expresado como la media  $\pm$  SEM. Control (n=20); JSK (n=21); LA (n=20),  $p=0,512$ , ANOVA).

A continuación, se estudió el efecto que dichos fármacos ejercen sobre la movilización y reciclamiento vesicular cuando son administrados 20 minutos previos a la estimulación conducente a la carga de FM1-43<sub>FX</sub> (fig 47A). Para ello se empleó la modalidad de MET con fotoconversión, lo que permitió identificar y cuantificar las vesículas recicladas (PC<sup>+</sup>) bajo los tratamientos con JSK y LA (fig 47B y C).

Se encontró una drástica reducción del porcentaje de orgánulos fotoconvertidos como resultado del tratamiento con JSK y LA previo a la estimulación (fig 47C; control:  $68,27 \pm 1,61\%$ ; JSK:  $60,13 \pm 2,25\%$ ; LA:  $48,92 \pm 2,00\%$ ,  $p<0,001$ , ANOVA con prueba de Holm-Sidak). El análisis de la frecuencia de distribución de VSs y endosomas reciclados en relación a la distancia a la zona activa (fig 47D) evidenció un alejamiento de éstos en las preparaciones tratadas con LA, hallándose una reducción significativa en el porcentaje de orgánulos a menos de 50 nm de ZA (control:  $8,72 \pm 1,37\%$ ; JSK:  $9,55 \pm 1,27\%$ ; LA:  $5,18 \pm 1,15\%$ ,  $p<0,001$ , prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's). El porcentaje de distribución de frecuencias de distancias a ZA para orgánulos PC<sup>-</sup> no mostró diferencias en la segregación espacial de éstos (no mostrado). El cociente endosoma/VSs no se vio alterado con JSK y/o LA (fig 47E; control:  $0,025 \pm 0,005$ ; JSK:  $0,023 \pm 0,004$ ; LA:  $0,023 \pm 0,005$ ,  $p=0,638$ , prueba de Kruskal-Wallis).

## Resultados

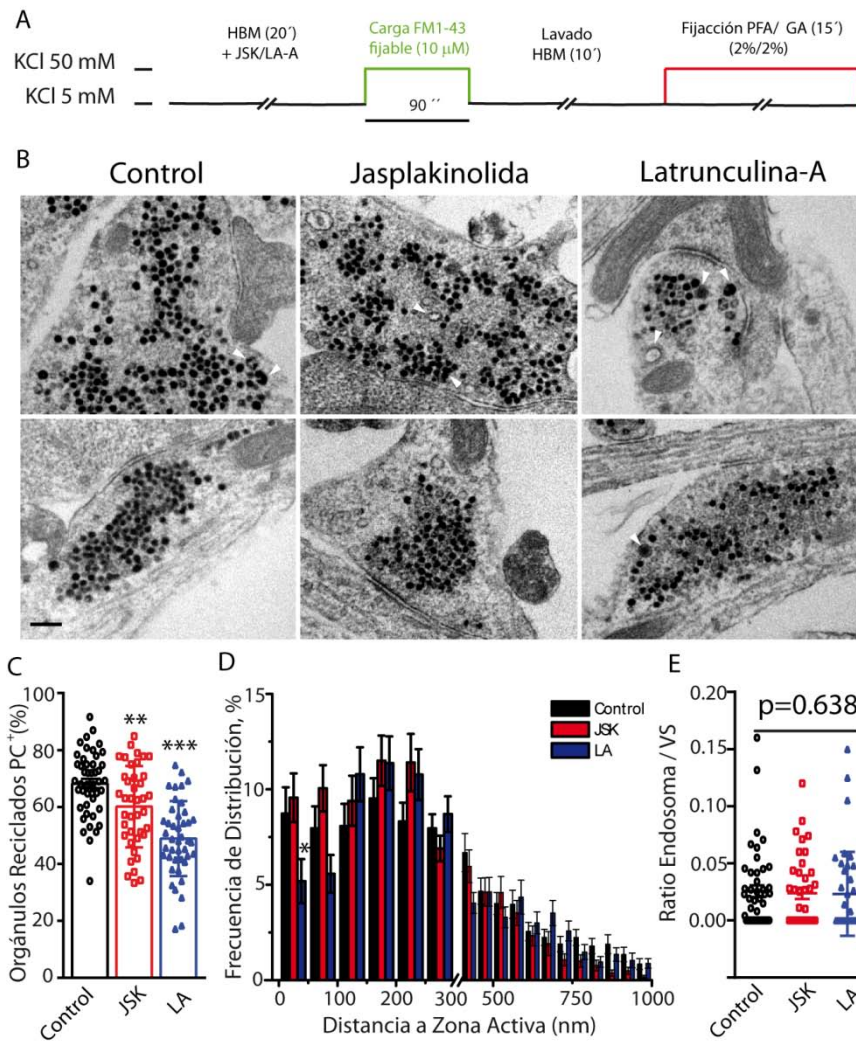


Figura 47: Efecto de la disrupción de la dinámica del citoesqueleto de actina previo a la estimulación sobre la ultraestructura de los botones sinápticos. A) Protocolo experimental: las células fueron incubadas con JSK (1 μM) o LA (12 μM) durante 20 minutos previos al paso de carga de FM1-43. Posteriormente fueron estimuladas (50 mM KCl 90s en presencia de FM1-43<sub>FX</sub>), lavadas, fijadas y preparadas para MET. B) Micrografías de células granulares de cerebelo mantenidas en condición control (paneles izquierdos) e incubados con JSK (paneles centrales) o LA (paneles derechos). Se indican las vesículas fotoconvertidas (PC<sup>+</sup>) y endosomas mediante puntas de flecha blancas. Barra de escala 200 nm. C) Cuantificación de orgánulos PC<sup>+</sup> y PC<sup>-</sup> en las diferentes condiciones experimentales. Gráfico de dispersión de puntos con la media ± SEM (control: n=48; JSK: n=40, LA: n=42; p<0,001, ANOVA seguido de prueba de Holm-Sidak, \*\*\*p<0,001) y \*\*p(<0,01) indica diferencias con respecto al control). D) Histograma de distribución de frecuencias mostrando la distancia de VSs y endosomas a la zona activa en compartimentos de 50 nm. Nótese la drástica reducción de VSs tras el

## Resultados

tratamiento con LA en los 50 nm más próximos a ZA (control: n=48; JSK: n=40; LA: n=42; p=0,004, prueba de Kruskal-Wallis seguido de método de Dunn's. \* muestra diferencias respecto al control. E) Gráfico de dispersión y media  $\pm$  SEM para el cociente endosoma/VS (control: n=46; JSK, n=40, LA: n=40; p=0,638, prueba de Kruskal-Wallis).

### 5.4.4. La dinámica del citoesqueleto de actina modula la eficacia de reciclamiento de una subpoblación de botones

En los siguientes experimentos, se incubaron las células con JSK (1  $\mu$ M) y LA (12  $\mu$ M) durante 20 minutos después de la carga de FM1-43, iniciándose el tratamiento tras 5 minutos de reposo en medio de lavado después del estímulo (fig 48A). Las cinéticas de descarga de FM1-43 normalizadas (fig 48B) mostraron una reducción del 20% de la fracción de sonda liberada en los botones de descarga fuerte previamente tratados con LA. Dicho efecto no era patente con JSK ni en la población de botones de descarga débil. Adicionalmente, se calcularon los valores de las constantes temporales de decaimiento biexponencial en ambas poblaciones de botones en los diferentes tratamientos farmacológicos (tabla 8), observándose que la contribución de la componente rápida ( $\tau_1$ ) en los botones de descarga débil tratados con LA fue significativamente mayor que en los botones control.

A la luz de este resultado, se cuantificaron los porcentajes de botones pertenecientes a cada grupo de respuesta (fig 48C), encontrándose una notable reducción del porcentaje de botones de descarga fuerte en los tratamientos con JSK y LA (control:  $58,26 \pm 4,54\%$ ; JSK:  $38,90 \pm 2,33\%$ ; LA:  $39,34 \pm 5,22\%$ , p=0,010, ANOVA seguido de prueba de Holm-Sidak). La cuantificación de la densidad de botones funcionales (fig 48D) mostró una reducción de este parámetro en las células incubadas previamente con LA, permaneciendo inalterado por el tratamiento con JSK (control:  $0,115 \pm 0,03$ ; JSK:  $0,106 \pm 0,016$ ; LA:  $0,064 \pm 0,013$ , p=0,007, ANOVA seguido de prueba de Holm-Sidak). Adicionalmente, se compararon los valores medios de fluorescencia inicial (fig 48E), encontrándose una menor intensidad de fluorescencia en las células tratadas con JSK, en ambas poblaciones de botones, y con LA, en la población de botones de descarga fuerte (descarga fuerte; control:  $1810,87 \pm 20,37$  u.a.; JSK:  $1453,41 \pm 17,44$  u.a.; LA:  $1555,93 \pm 25,34$  u.a.; descarga débil: control:  $2103,73 \pm 38,66$  u.a.; JSK:  $1889,83 \pm 28,58$  u.a.; LA:  $2125,97 \pm 28,67$  u.a.; p<0,001, prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's). La fluorescencia neta liberada durante la estimulación se

## Resultados

redujo con JSK y LA en la población de botones de descarga fuerte, pero no se encontraron diferencias en los botones de descarga débil entre cada uno de los tratamientos y el control (descarga fuerte; control:  $1108,51 \pm 12,51$  u.a.; JSK:  $867,49 \pm 10,66$  u.a.; LA:  $870,71 \pm 14,47$  u.a.,  $p < 0,001$ , prueba de Kruskal-Wallis seguido de método de Dunn's; descarga débil: control:  $704,10 \pm 15,33$  u.a.; JSK:  $676,35 \pm 11,2$  u.a.; LA:  $695,23 \pm 11,04$  u.a.;  $p = 0,031$ , prueba de Kruskal-Wallis seguido de método de Dunn's).

Tabla 8: Valores de las constantes temporales de decaimiento exponencial ( $\tau$ ).									
	d.f. Ctrl	d.d. Ctrl	*p valor	d.f. JSK	d.d. JSK	*p valor	d.f. LA	d.d. LA	*p valor
$\tau_1$ (s)	$5,71 \pm 0,37$	$8,83 \pm 0,94$	0,042	$6,93 \pm 0,60$	$9,34 \pm 0,70$	0,123	$6,27 \pm 0,75$	$10,71 \pm 1,76$	0,040
$\tau_2$ (s)	$53,90 \pm 3,58$	$75,65 \pm 5,36$	0,0009	$64,93 \pm 4,43$	$76,85 \pm 5,30$	0,275	$65,99 \pm 6,99$	$75,17 \pm 13,77$	0,110
% $\tau_1$	$59,71 \pm 3,70$	$27,30 \pm 3,80$	0,0049	$61,67 \pm 0,92$	$28,98 \pm 3,34$	0,0005	$65,85 \pm 2,57$	$40,20 \pm 4,46$ $p = 0,03$	0,0003

Valores de las constantes temporales de decaimiento exponencial ( $\tau$ ) para los botones de descarga fuerte (d.f.) y débil (d.d.) en los diferentes tratamientos farmacológicos obtenidas mediante ajuste de las cinéticas a un modelo exponencial negativo de segundo orden. Se representan los valores de  $\tau_1$  (rápida),  $\tau_2$  (lenta) y porcentaje (%) de la contribución de la componente  $\tau_1$  en la cinética de descarga. Los p-valores muestran la comparación estadística mediante t de Student entre los grupos de descarga fuerte y débil de la misma condición. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos farmacológicos salvo en

## Resultados

el porcentaje de la componente  $\tau_1$  en la condición d.d. LA, que fue significativamente superior a la de la condición Ctrl.

En su conjunto, estos resultados ponen de manifiesto el papel decisivo que juega el citoesqueleto de actina en la exocitosis de neuronas granulares sometidas a una estimulación de gran intensidad.

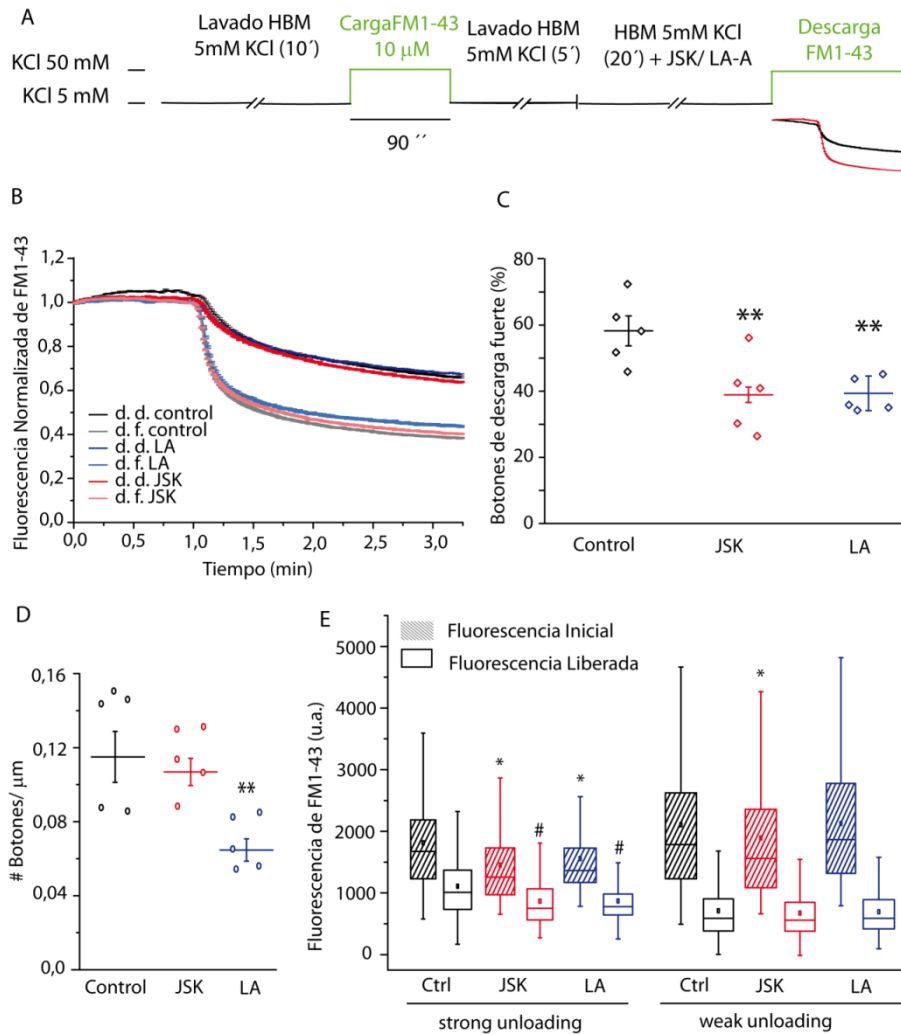


Figura 48: Efecto de la disrupción de la dinámica del citoesqueleto de actina después de una estimulación intensa y prolongada sobre el reciclamiento vesicular sináptico. A) Protocolo experimental: las células fueron incubadas con JSK (1  $\mu$ M) o LA (12  $\mu$ M) durante 20 min, comenzando 5 minutos después del cese del estímulo para la carga de FM1-43. B) Cinéticas medias de liberación de FM1-43 para los botones pertenecientes al grupo de descarga fuerte

## Resultados

(d.f.) y descarga débil (d.d.) en las tres condiciones experimentales, normalizado al valor de fluorescencia inicial (grupo de descarga fuerte: control N=1702; JSK N=1465; LA N=573; grupo descarga débil: control N=1047; JSK N=1456; LA N=1214). C) Gráfico de dispersión para el porcentaje de botones de descarga fuerte con media  $\pm$  SEM. n=5 cada condición, p=0,01, ANOVA seguido de prueba de Holm-Sidak. \*\*p=0,007 JSK vs. control y \*\*p=0,008 LA vs. control. D) Gráfico de dispersión para la densidad de botones funcionales (círculos vacíos) y media  $\pm$  SEM. n=5 en cada condición, p=0,007, ANOVA seguido de prueba de Holm-Sidak para comparaciones con el control, p=0,562 JSK vs control y p=0,003 LA vs control). E) Gráfico de cajas y bigotes para la fluorescencia inicial (cajas rayadas) y liberada (cajas vacías) de FM1-43 en células control o tras los tratamientos con JSK o LA. "\*" y "#" muestran diferencias con respecto al control para la fluorescencia inicial (p<0,001, prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's en ambas poblaciones de botones) y fluorescencia liberada (p<0,001, prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's para la población de botones de descarga fuerte; p=0,031, prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's para la población de botones de descarga débil) respectivamente. Descarga fuerte: control (N=1702); JSK (N=1465); LA (N=573); descarga débil: control (N=1047); JSK (N=1456); LA (N=1214).

### 5.4.5. Análisis ultraestructural de los terminales sinápticos tratados con jasplakinolida o latrunculina-A tras una estimulación intensa y prolongada

En paralelo a los estudios realizados con FM1-43 (fig 48), se llevó a cabo un análisis de microscopía electrónica con fotoconversión emulando las condiciones de estimulación y posterior tratamiento con los fármacos JSK y LA (fig 49A), con el objeto de tener un correlato estructural que facilitase la interpretación de los estudios con FM1-43.

Tras el análisis de los resultados, se advirtió una disminución del porcentaje de orgánulos fotoconvertidos (PC<sup>+</sup>) en aquellos terminales estimulados y posteriormente incubados 20 minutos con latrunculina-A (fig 49B y C; control: 57,53  $\pm$  1,87%; JSK: 62,70  $\pm$  1,78%; LA: 47,99  $\pm$  1,97%, p<0,001, prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's). Este hecho evidencia la implicación de la polimerización de actina durante la fase endocítica del ciclo vesicular, lo cual se ve acompañado de perfiles endocíticos arrestados en las micrografías con LA (flechas rojas).

Estos resultados fueron acompañados de un cambio significativo en la distribución espacial de los orgánulos PC<sup>+</sup> con respecto a la distancia a la zona activa en las células tratadas con LA (fig 49D). Se observó una disminución del porcentaje de VSs

## Resultados

situadas a menos de 150 nm de la zona activa con respecto a la situación control (de 0-50 nm, control:  $10,99 \pm 1,41\%$ ; JSK:  $11,08 \pm 2,04\%$ ; LA:  $6,89 \pm 1,49\%$ ;  $p=0,003$ , prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's; de 50-100 nm, control:  $12,00 \pm 1,32\%$ ; JSK:  $12,35 \pm 1,50\%$ ; LA:  $7,16 \pm 1,22\%$ ,  $p=0,01$ , prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's; de 100-150nm, control:  $11,71 \pm 1,06\%$ ; JSK:  $10,70 \pm 1,08\%$ ; LA:  $7,34 \pm 1,28\%$ ,  $p<0,001$ , prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's).

La relación endosoma/V5 (fig 49E) no se vio afectada por dichos tratamientos (control:  $0,036 \pm 0,006$ ; JSK:  $n=0,039 \pm 0,007$ ; LA:  $0,036 \pm 0,006$ ,  $p=0,860$ , prueba de Kruskal-Wallis).

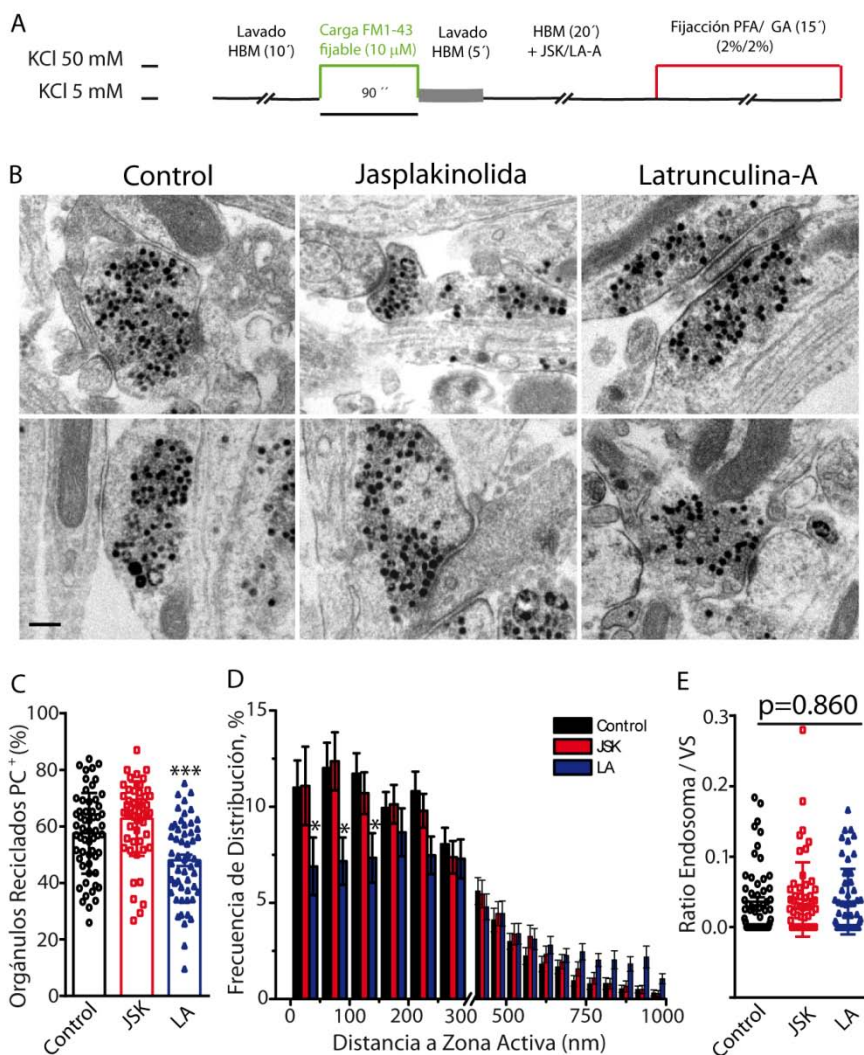


Figura 49. Efecto ultraestructural de la desestabilización del citoesqueleto de actina tras una estimulación intensa y prolongada. A) Protocolo experimental: las células fueron incubadas con JSK (1 mM) o LA (12 mM) durante 20 min, 5 minutos después del estímulo conducente a la

## Resultados

carga de FM1-43. Seguidamente fueron fijadas y preparadas para MET-PC. B) Imágenes de microscopía electrónica de células granulares en condición control (izquierda), tratadas con JSK (paneles centrales) y tratadas con LA (paneles derechos). Barra de escala 200 nm. C) Porcentaje de orgánulos fotoconvertidos ( $PC^+$ ) y no fotoconvertidos ( $PC^-$ ) bajo las diferentes condiciones experimentales. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM de control (n=58), JSK (n=54) y LA (n=54);  $p < 0,001$ , prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's. \* muestra diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control. D) Histograma de distribución de frecuencias para las distancias de los orgánulos  $PC^+$  a zona activa por compartimentos de 50 nm. Nótese la reducción de VSs tras el tratamiento con LA en los 150 nm más próximos a ZA (de 0-50 nm:  $p = 0,003$ ; de 50-100 nm:  $p = 0,001$ ; de 100-150 nm:  $p < 0,001$ ; prueba de Kruskal-Wallis con método de Dunn's para todos los compartimentos. \* muestra diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control). Control (n=58); JSK (n=54); LA (n=54). E) Gráfico de cajas y bigotes para el cociente endosoma/Vs (control n=58; JSK n=54; LA n=54;  $p = 0,860$ , prueba de Kruskal-Wallis).

### 5.4.6. El reportero vGluT1-pGHluorina revela defectos excitotóxicos en células tratadas con JSK y LA

Los resultados mostrados en el apartado 5.4.4 relativos a la fluorescencia liberada, indican que tanto la estabilización de los filamentos de actina con JSK como su despolimerización con LA inhibe la excitotoxicidad, al menos en una subpoblación de botones. Con objeto de verificarlo, se realizaron estudios con el reportero, codificado genéticamente, vGluT1-pHluorina. Para ello, se realizó un experimento de doble estimulación con medio HBM 50 mM KCl, siendo el primero de los estímulos de 10 s de duración y el segundo de 30 s, dejando un intervalo inter-estímulo de 2 min (fig 50A). Los resultados mostraron una clara disminución de la respuesta excitotóxica de los botones tratados con LA (fig 50A y C) y JSK (fig 50A y D) tras una estimulación de 10 s (área bajo la curva, control:  $0,03 \pm 0,02$  u.a.; LA:  $0,016 \pm 0,002$  u.a.,  $p < 0,001$  vs control, prueba de t de Student; JSK:  $0,010 \pm 0,002$  u.a.,  $p < 0,001$  vs control, prueba de t de Student), evidenciando, de este modo, la implicación de la dinámica del citoesqueleto de actina en la etapa excitotóxica del ciclo vesicular. Este efecto también fue patente en la estimulación de 30 s con LA (fig 50C) y con JSK (fig 50D; área bajo la curva, control:  $0,060 \pm 0,0002$  u.a.; LA:  $0,050 \pm 0,0002$  u.a.,  $p < 0,001$ , prueba de t de Student; JSK:  $0,046 \pm 0,003$  u.a.,  $p = 0,026$  vs control, prueba de t de Student). Este hecho pone de manifiesto la importancia de la dinámica de la remodelación del

## Resultados

citoesqueleto de actina en la translocación de vesículas a la zona activa en botones sometidos a estimulaciones intensas y de mayor duración.

Las cinéticas de reacidificación vesicular revelaron una mayor velocidad de endocitosis tras el primer estímulo en los botones tratados con LA, pero no en los tratados con JSK (valores de  $\tau$ , control:  $11,02 \pm 1,03$  s; LA:  $7,69 \pm 0,43$  s,  $p=0,018$ , prueba de Mann-Whitney; JSK:  $9,11 \pm 0,45$  s,  $p=0,190$  vs control, prueba de Mann-Whitney).

Adicionalmente, se observó que los botones tratados con LA, y sometidos a los dos estímulos aludidos previamente, mostraban un incremento progresivo en la fluorescencia de vGluT1-pHlorina tras el segundo de los estímulos (fig 50A y C). Este comportamiento es indicativo de una mayor liberación vesicular no-inducida, un hecho que podría justificar la disminución de orgánulos fotoconvertidos en las células tratadas con LA cuando dicho tratamiento se lleva a cabo después de la estimulación conducente a la carga de la sonda (fig 50C).

## Resultados

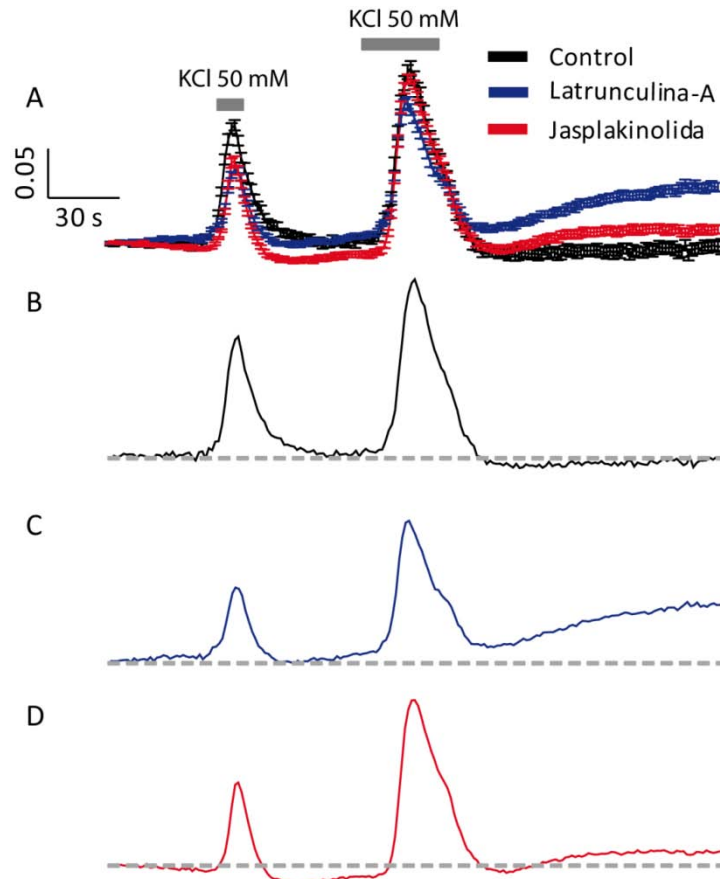


Figura 50: La incubación con LA y JSK disminuye la magnitud de la respuesta a dos estímulos consecutivos de diferente duración. A) Cinéticas de fluorescencia de botones de células granulares transfectadas con vGluT1-pHluorina sometidos a dos estímulos con KCl 50 mM de 10 y 30 s respectivamente. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de la respuesta normalizada al máximo de fluorescencia obtenido mediante alcalinización con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en botones control (N=90; n=3 preparaciones), botones tratados con LA (N=104, n=3) y botones tratados con JSK (N=200; n=3). B,C y D) Cinética individualizada de los botones control, tratados con JSK y tratados con LA respectivamente, mostrándose la línea base mediante trazo discontinuo.

## Resultados

### **5.5. Las neuronas corticales carentes del gen FMR1 (Fmr1 KO) muestran un reciclamiento vesicular más eficiente**

#### **5.5.1. La despolimerización del citoesqueleto de actina disminuye la intensidad de marcaje en neuronas corticales carentes de FMR1 y aumenta la velocidad de liberación**

Entre las múltiples rutas de señalización afectadas, que se han descrito, en ratones carentes del gen FMR1 se encuentran las que regulan la polimerización y reorganización del citoesqueleto de actina. Estas vías de señalización están coordinadas por el complejo de señalización mTORC2, cuya actividad se encuentra manifiestamente alterada en el síndrome del X Frágil (Dolan *et al.* 2013, Huber *et al.* 2015, Cavolo *et al.* 2016, Tabet *et al.* 2016).

Tal y como hemos mostrado en secciones anteriores, la interferencia con la dinámica del citoesqueleto de actina afecta de manera significativa al ciclo vesicular en neuronas granulares de cerebelo de rata. Por tanto, para estudiar el efecto de la dinámica del citoesqueleto de actina sobre el ciclo vesicular de las neuronas corticales de ratones carentes del gen FMR1 y genotipo salvaje, se llevaron a cabo incubaciones con los fármacos JSK y LA durante los 20 min previos a la carga de la sonda FM1-43 (fig 51A). Los valores de fluorescencia inicial medidos al inicio del periodo monitorizado mostraron una reducción significativa en las células Fmr1 KO tratadas con LA en relación a la situación control, tanto en la población de botones de descarga fuerte (control:  $1172,86 \pm 155,03$  u.a.; LA:  $793,37 \pm 26,07$  u.a.,  $p=0,0012$ , prueba de t de Student; fig 51B) como en la población de botones de descarga débil (fig 51C; control:  $1116,22 \pm 308,14$  u.a.; LA:  $751,14 \pm 81,02$  u.a.,  $p=0,0056$ , prueba de t de Student). Además, en los botones tratados con LA se observaron valores de fluorescencia inicial notablemente inferiores en las células Fmr1 KO en comparación a sus homólogas WT (grupo de descarga fuerte, WT:  $989,37 \pm 60,11$  u.a.; Fmr1 KO:  $793,65 \pm 26,07$  u.a.,  $p=0,02$ , prueba de t de Student; grupo de descarga débil, WT:  $950,51 \pm 139,54$  u.a.; Fmr1 KO:  $751,14 \pm 81,02$  u.a.,  $p=0,0095$ , prueba de t de Student). Es importante señalar que en las neuronas WT ninguno de los tratamientos produjo un efecto significativo en la fluorescencia acumulada en los botones. Estos hechos, ponen de manifiesto que el ciclo vesicular en neuronas Fmr1 KO depende en mayor medida de la dinámica del citoesqueleto de actina que en neuronas WT.

## Resultados

Se analizaron también las cinéticas de liberación de FM1-43 obtenidas tras la perfusión de KCl 50 mM durante 3 min (fig 51D-G). Los perfiles cinéticos no mostraron diferencias evidentes en los porcentajes de descarga, sin embargo el ajuste de dichas cinéticas a modelos de decaimiento biexponenciales y monoexponenciales, para los botones de descarga fuerte y débil respectivamente, sí pusieron de manifiesto cambios en las cinéticas. De este modo, tras la estabilización de los filamentos de actina, por el tratamiento con JSK, en células WT se observó un aumento en la velocidad de liberación tanto en los botones de descarga fuerte ( $\tau_1$ , control:  $13,93 \pm 1,62$  s; JSK:  $9,35 \pm 1,09$  s,  $p < 0,001$ , prueba de t de Student; fig 51D, D<sub>1</sub>;  $\tau_2$ , control:  $84,64 \pm 10,35$  s, JSK:  $63,78 \pm 6,03$  s,  $p < 0,001$ , prueba de t de Student; fig 51D, D<sub>2</sub>), como en los botones de descarga débil ( $\tau$ , control:  $63,76 \pm 2,37$  s; JSK:  $54,84 \pm 2,02$  s,  $p = 0,02$ , prueba de t de Student; fig 51E, E<sub>1</sub>). Sin embargo, en las células Fmr1 KO sólo se observó una disminución del valor de  $\tau$  en los botones de descarga débil (fig 51E, E<sub>1</sub>; control:  $58,12 \pm 2,03$  s; JSK:  $50,32 \pm 1,65$  s,  $p < 0,001$ , prueba de t de Student), mientras que se apreciaron cambios significativos en la cinética de los botones de descarga fuerte (fig 51D, D<sub>2</sub>). Por el contrario, la despolimerización de actina, causada por el tratamiento con LA, aumentó la velocidad de liberación en los dos tipos de botones tanto en células WT como en Fmr1 KO, traduciéndose en una reducción de los valores de  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , en WT ( $\tau_1$ , control:  $13,93 \pm 1,62$  s; LA:  $9,45 \pm 1,15$  s,  $p < 0,001$ , prueba de t de Student;  $\tau_2$ , control:  $84,64 \pm 10,35$  s; LA:  $59,98 \pm 13,25$  s,  $p = 0,011$ , prueba de t de Student; fig 51F-F<sub>2</sub>) y en Fmr1 KO ( $\tau_1$ , control:  $11,64 \pm 3,27$  s; LA:  $8,25 \pm 0,83$  s,  $p = 0,0039$ , prueba de t de Student;  $\tau_2$ , control:  $76,56 \pm 5,89$  s; LA:  $55,68 \pm 5,88$  s,  $p < 0,001$ , prueba de t de Student; fig 51F-F<sub>2</sub>).

En la población de botones de descarga débil se observó un aumento de la velocidad de liberación en las células tratadas con LA (fig 51G, G<sub>1</sub>), tanto en células WT (control:  $63,76 \pm 2,37$  s, LA:  $51,07 \pm 1,82$  s,  $p = 0,002$ , prueba de t de Student) como en células Fmr1 KO (control:  $58,12 \pm 2,03$  s; LA:  $47,11 \pm 2,47$  s,  $p < 0,001$ , prueba de t de Student). Estos resultados ponen de manifiesto que la despolimerización de los filamentos de actina con LA en células Fmr1 KO se traduce en un menor marcaje vesicular en ambos tipos de botones, mientras que no afecta al marcaje de los botones de las células WT. Este efecto se acompaña de cambios en la cinética de liberación de las VSs marcadas, donde se observa una mayor velocidad de liberación en las células tratadas con LA de ambos genotipos, tanto en la población de botones de descarga fuerte como de descarga débil. Además, en la población de botones de descarga débil,

## Resultados

el tratamiento con LA disminuye la fracción de VSs marcadas liberadas en el genotipo WT, igualándola a la obtenida en neuronas Fmr1 KO sometidas al mismo tratamiento.

# Resultados

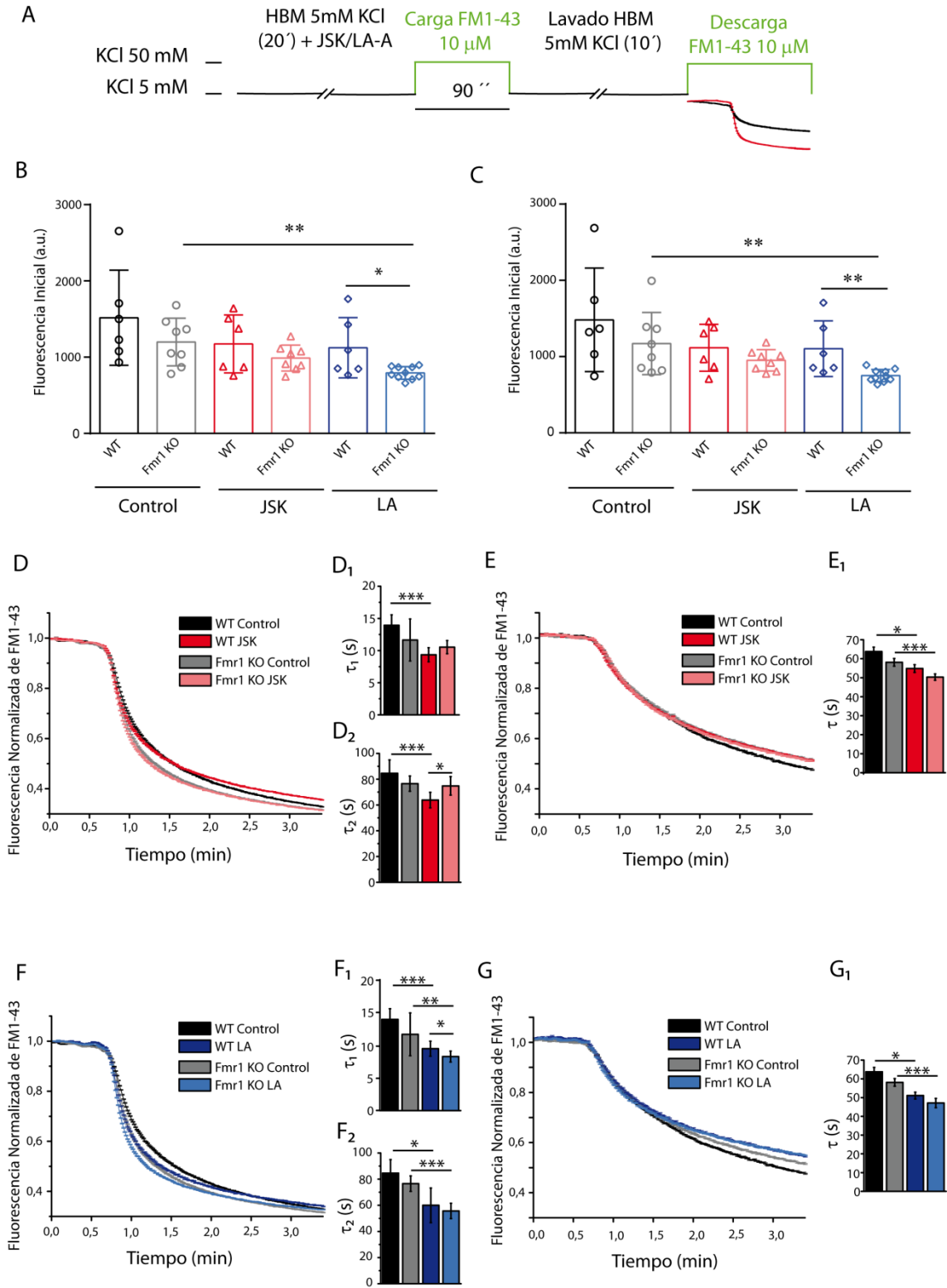


Figura 51: Efecto de la disrupción de la dinámica del citoesqueleto de actina sobre el marcaje y reciclamiento vesicular en neuronas corticales WT y Fmr1 KO. A) Protocolo experimental: las

## Resultados

células fueron incubadas con JSK (1  $\mu\text{M}$ ) o LA (12  $\mu\text{M}$ ) durante 20 minutos previos a la carga de FM1-43. B-C) Gráfico de dispersión de puntos para los valores de fluorescencia inicial con valores medios  $\pm$  SEM para las diferentes condiciones experimentales de los botones de descarga fuerte (B; WT, control: 1516,87  $\pm$  254,86 u.a., n=6; JSK: 1124,32  $\pm$  161,44 u.a., n=6; LA: 989,37  $\pm$  60,11 u.a., n=8; Fmr1 KO: 1172,86  $\pm$  155,03 u.a., n=6; JSK: 1197,93  $\pm$  110,58 u.a., n=8; LA: 793,65  $\pm$  26,07 u.a., n=10) y débil (C; WT, control: 1482,27  $\pm$  277,27 u.a., n=6; JSK: 1103,42  $\pm$  148,64 u.a., n=6; LA: 950,51  $\pm$  49,133 u.a., n=8; Fmr1 KO: 1116,26  $\pm$  125,80 u.a., n=6; JSK: 1170,62  $\pm$  144,17 u.a., n=8; LA: 751,14  $\pm$  25,62 u.a., n=10). D) Cinética de liberación de FM1-43 de botones de descarga fuerte tratados con JSK. D<sub>1</sub>) Valores de  $\tau_1$  obtenidos mediante ajuste a un modelo biexponencial. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM. D<sub>2</sub>) Valores de  $\tau_2$  expresados como la media  $\pm$  SEM. E) Cinética de liberación de FM1-43 de los botones de descarga débil tratados con JSK. E<sub>1</sub>) Valores de  $\tau$  obtenidos mediante ajuste a un modelo monoexponencial. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM. F) Cinética de liberación de FM1-43 de botones de descarga fuerte tratados con LA. F<sub>1</sub>) Valores de  $\tau_1$  obtenidos mediante ajuste a un modelo biexponencial. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM. F<sub>2</sub>) Valores de  $\tau_2$  expresados como la media  $\pm$  SEM. G) Cinética de liberación de FM1-43 de los botones de descarga débil tratados con LA. G<sub>1</sub>) Valores de  $\tau$  obtenidos mediante ajuste a un modelo monoexponencial. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM. Tamaños de población (N) de las figuras D y F; WT: control (3605), JSK (3605), LA (3247); Fmr1 KO: control (5066), JSK (6258), LA (6418). Tamaños de población (N) de las figuras E y G: WT: control (1444), JSK (1458), LA (1556); Fmr1 KO: control (1505), JSK (1423), LA (1754).

### **5.5.2. La disrupción farmacológica de la dinámica del citoesqueleto de actina no produce alteraciones en la ultraestructura de neuronas corticales WT o Fmr1 KO en situación de reposo**

Con el fin de esclarecer si la disrupción farmacológica de la dinámica del citoesqueleto de actina afecta a la ultraestructura de neuronas corticales de 14 DIV de los genotipos WT y Fmr1 KO en situación de reposo, las células se incubaron con JSK 1  $\mu\text{M}$  ó LA 12  $\mu\text{M}$  durante 20 min en medio HBM de lavado y posteriormente se fijaron para procesarse para microscopía electrónica. Las imágenes de microscopía electrónica no mostraron alteraciones macroscópicas como resultado de los tratamientos farmacológicos (fig 52A). Se analizaron diferentes parámetros: superficie de la sección del terminal sináptico, longitud de la zona activa y densidad de VSs. No se observó ningún cambio significativo en la superficie de los terminales sinápticos entre las diferentes condiciones experimentales y/o entre genotipos (en  $\mu\text{m}^2$ ; control, WT: 0,37  $\pm$

## Resultados

0,04, Fmr1 KO:  $0,38 \pm 0,04$ ; JSK, WT:  $0,38, \pm 0,03$  Fmr1KO:  $0,35 \pm 0,04$ ; LA, WT:  $0,32 \pm 0,03$ , Fmr1 KO:  $0,32 \pm 0,03$ ,  $p=0,774$ , prueba de Kruskal-Wallis). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la longitud de la zona activa (fig 52B; control, WT:  $421,00 \pm 39,95$  nm, Fmr1 KO:  $393,80 \pm 29,92$  nm,  $p=0,91$ , prueba de Mann-Whitney; JSK, WT:  $309,05 \pm 28,99$  nm, Fmr1 KO:  $372,08 \pm 28,15$  nm,  $p=0,11$ , prueba de Mann-Whitney; LA, WT:  $299,75 \pm 16,82$  nm, Fmr1 KO:  $352,19 \pm 24,55$  nm,  $p=0,21$ , prueba de Mann-Whitney). Sin embargo, la cuantificación de la densidad de vesículas sinápticas en las diferentes condiciones experimentales (fig 52C) mostró un aumento de dicho parámetro en neuronas Fmr1 KO en las diferentes condiciones experimentales (datos expresados en  $n^{\circ}$  VS/ $\mu\text{m}^2$ ; control, WT:  $191,19 \pm 9,81$ , Fmr1 KO:  $218,47 \pm 10,39$ ,  $p=0,06$ , prueba de t de Student; JSK, WT:  $172,81 \pm 7,21$ , Fmr1 KO:  $219,65 \pm 13,70$ ,  $p=0,012$ , prueba de Mann-Whitney; LA, WT:  $196,90 \pm 9,57$ , Fmr1 KO:  $250,53 \pm 12,20$ ,  $p=0,001$ , prueba de t de Student).

Posteriormente se analizó el número de vesículas amarradas a la membrana, "docked", en las diferentes condiciones experimentales (fig 52D), observándose un mayor número de éstas en el genotipo Fmr1 KO en las condiciones control y tratadas con JSK (control, WT:  $1,86 \pm 0,25$ ; Fmr1 KO:  $3,83 \pm 0,46$ ,  $p<0,001$ , prueba de Mann-Whitney; JSK, WT:  $2,5 \pm 0,40$ ; Fmr1 KO:  $3,31 \pm 0,31$ ,  $p=0,04$ , prueba de Mann-Witney; LA, WT:  $2,5 \pm 0,31$ ; Fmr1 KO:  $3,26 \pm 0,40$ ,  $p=0,129$ , prueba de Mann-Whitney). A su vez, los tratamientos farmacológicos no produjeron cambios en las neuronas WT ( $p=0,288$ , prueba de Kruskal-Wallis) ni en neuronas Fmr1 KO ( $p=0,728$ , prueba de Kruskal-Wallis).

Dada la implicación del citoesqueleto de actina en la translocación de vesículas y en su aproximación y anclaje a la zona activa, se analizó la distribución espacial de éstas en los terminales sinápticos, cuantificando para ello la frecuencia relativa de VSs en compartimentos de 10 nm de distancia a la zona activa (fig 52E-G). Los histogramas de frecuencias no muestran diferencias significativas en el porcentaje de vesículas más próximas a la zona activa o amarradas ( $<10$  nm) entre genotipos para las diferentes condiciones experimentales.

Estos resultados ponen de manifiesto que la ultraestructura de neuronas corticales en condición de reposo de los genotipos WT y Fmr1 KO no se afecta ni por la estabilización de los filamentos de actina ni por su despolimerización.

# Resultados

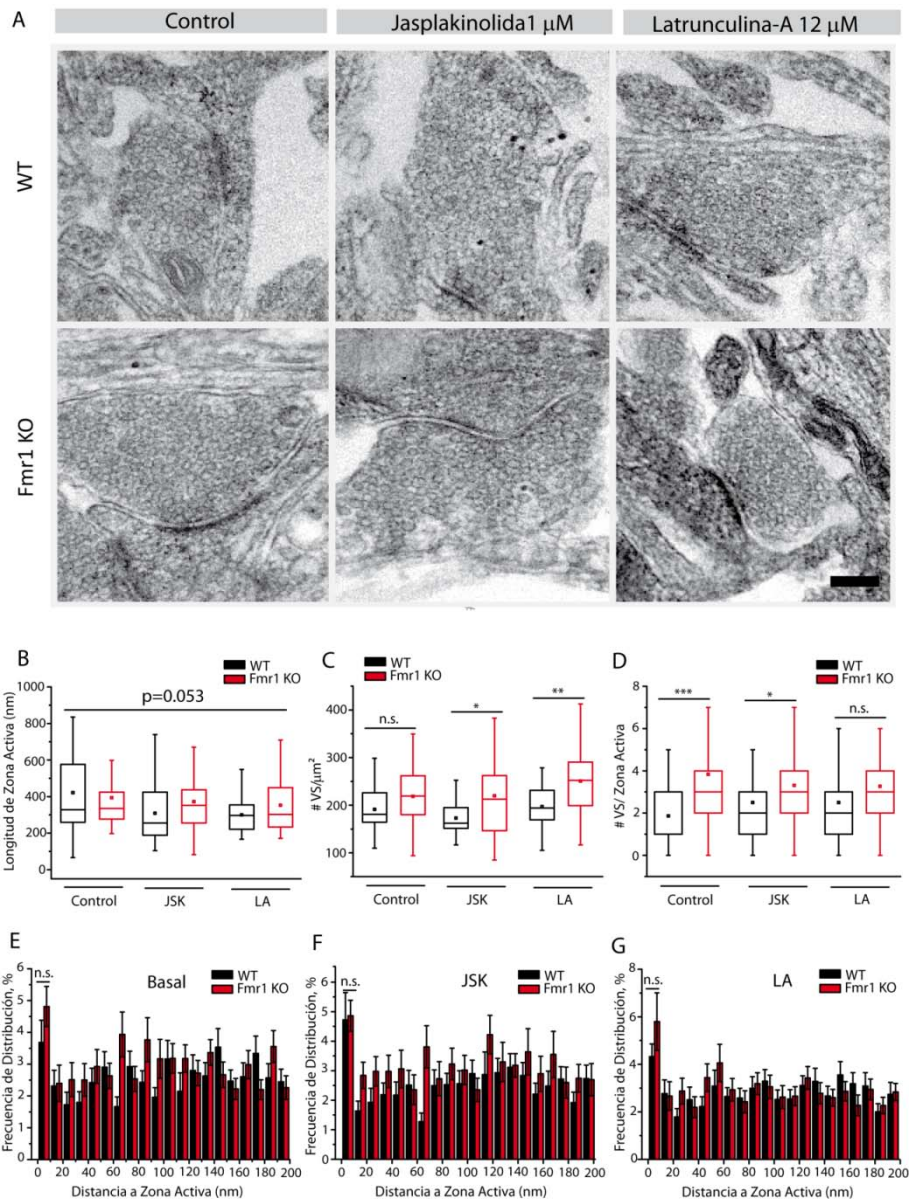


Figura 52: La disrupción del citoesqueleto de actina en situación de reposo no afecta a la ultraestructura de neuronales corticales de los genotipos WT y Fmr1 KO. A) Imágenes de microscopía electrónica de neuronas corticales WT (paneles superiores) y Fmr1 KO (paneles inferiores) en las condiciones control (izquierda), tratadas con JSK 1  $\mu$ M 20 min (centro) y tratadas con LA 12  $\mu$ M (derecha). Barra de escala 200 nm. B) Gráfico de cajas y bigotes para la longitud de la zona activa en las 3 condiciones experimentales (control, WT n=31; Fmr1 KO n=34,  $p=0,91$  prueba de Mann-Whitney; JSK, WT n=29; Fmr1 KO n=36  $p=0,11$ , prueba de Mann-Whitney; LA, WT n=32; Fmr1 KO n=33;  $H=10,92$ ,  $p=0,21$ , prueba de Mann-Whitney). C) Gráfico de cajas y bigotes para la densidad de VSs en las diferentes condiciones experimentales (control, WT n=30; Fmr1 KO n=31,  $p=0,06$ , prueba de t de Student; JSK, WT

## Resultados

n=26; Fmr1 KO n=32,  $p=0,012$ , prueba de Mann-Whitney; LA, WT n=30; Fmr1 KO n=30,  $p=0,001$ , prueba de t de Student). D) Gráfico de cajas y bigotes para el número de VSs amarradas a la zona activa en las diferentes condiciones experimentales (control, WT n=30; Fmr1 KO n=30,  $p<0,001$ , prueba de Mann-Whitney; JSK, WT n=26; Fmr1 KO n=32,  $p=0,04$ , prueba de Mann-Whitney; LA, WT n=30; Fmr1 KO n=30,  $p=0,129$ , prueba de Mann-Whitney). E-G) Histogramas de distribución de frecuencias porcentuales para la distancia a zona activa por compartimentos de 10 nm en las diferentes condiciones experimentales. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM para los compartimentos de 10 nm y la significación estadística para el primero de ellos. Control (E; WT n=30; Fmr1 KO n=31,  $p=0,076$ , prueba de Mann-Whitney), JSK (F; WT n=26; Fmr1 KO n=32;  $p=0,189$ , prueba de Mann-Whitney), LA (G; WT n=30; Fmr1 KO  $p=0,853$ , prueba de Mann-Whitney).

### **5.5.3. El análisis ultraestructural de neuronas corticales revela una mayor densidad de vesículas sinápticas en los terminales Fmr1 KO y una mayor proporción de vesículas en íntima aposición con la zona activa**

Una vez analizada la ultraestructura de neuronas corticales WT y Fmr1 KO en condición de reposo (fig 52), se procedió a analizar el efecto que tiene la estimulación química (KCl 50 mM 90s) sobre la misma. Para ello, se establecieron 3 condiciones experimentales para ambos genotipos: células sin tratamiento (basal), estimuladas 90s con KCl 50 mM y fijadas inmediatamente y células estimuladas 90s con KCl 50 mM y fijadas tras 10 min en medio HBM de lavado (fig 53A). Estas condiciones permiten el estudio comparativo de la ultraestructura entre genotipos y/o condiciones experimentales.

La longitud de la zona activa no mostró cambios significativos entre ambos genotipos en las condiciones basal y estimuladas y fijadas a los 10 min (basal, WT:  $421 \pm 39$  nm, Fmr1 KO:  $393,8 \pm 29,92$  nm,  $p=0,911$ , prueba de Mann-Whitney; estimulado y fijado a 10 min, WT:  $416,54 \pm 34,72$  nm, Fmr1 KO:  $343,88 \pm 22,56$  nm,  $p=0,139$ , prueba de Mann-Whitney). Sin embargo, si se observó una reducción significativa de la longitud de la zona activa en las neuronas corticales Fmr1 KO en contraposición a sus homólogas WT cuando se fijaron inmediatamente después del estímulo (WT:  $397,79 \pm 34,30$  nm, Fmr1 KO:  $302,19 \pm 23,45$  nm,  $p=0,034$ , prueba de Mann-Whitney; fig 53B).

Adicionalmente, se cuantificó el número de vesículas por unidad de superficie en ambos genotipos (fig 53C), encontrándose un notable aumento de dicho parámetro en

## Resultados

las neuronas corticales Fmr1 KO previamente estimuladas (datos expresados como  $n^{\circ}$  VSs/ $\mu\text{m}^2$ ; basal, WT:  $191,19 \pm 9,8$ , Fmr1 KO:  $218,47 \pm 10,38$ ,  $p=0,06$ , prueba de t de Student; estimulado y fijado a 0 min, WT:  $181,31 \pm 13,51$ , Fmr1 KO:  $235,68 \pm 12,51$ ,  $p<0,001$ , prueba de Mann-Whitney; estimulado y fijado a 10 min, WT:  $182,29 \pm 6,38$ , Fmr1 KO:  $243,43 \pm 8,97$ ,  $p<0,001$ , prueba de t de Student). En paralelo a estos resultados se constató que la proporción endosoma/VS estaba aumentada en neuronas W de las 3 condiciones experimentales (basal, WT:  $0,22 \pm 0,03$ ; Fmr1 KO:  $0,09 \pm 0,01$ ,  $p=0,003$ , prueba de Mann-Whitney; estimulado y fijado a 0 min, WT:  $0,21 \pm 0,03$ ; Fmr1 KO:  $0,03 \pm 0,009$ ,  $p<0,001$ , prueba de Mann-Whitney; estimulado y fijado a 10 min, WT:  $0,10 \pm 0,01$ ; Fmr1 KO:  $0,03 \pm 0,007$ ,  $p=0,002$ , prueba de Mann-Whitney), habiéndose descrito una correlación inversa entre el número de VSs y la proporción endosoma/VSs (Bartolome-Martin *et al.* 2012, Ramperez *et al.* 2017).

El aumento de la densidad de VSs en las neuronas corticales Fmr1 KO se acompañó de un mayor número de VSs amarradas a la zona activa o "docked" en la condición basal y de forma más notoria en la condición estimulada y fijada a 0 min (fig 53D). Sin embargo, esta diferencia desapareció transcurridos 10 minutos tras la estimulación (basal, WT:  $1,86 \pm 0,25$ ,  $n=30$ ; Fmr1 KO:  $3,83 \pm 0,46$ ,  $n=30$ ,  $p<0,001$ , prueba de Mann-Whitney; estimulado y fijado a 0 min, WT:  $2,23 \pm 0,25$ ,  $n=30$ ; Fmr1 KO:  $4,77 \pm 0,28$ ,  $n=31$ ,  $p<0,001$ , prueba de Mann-Whitney; estimulado y fijado a 10 min, WT:  $2,81 \pm 0,27$ ,  $n=33$ ; Fmr1 KO:  $3,51 \pm 0,32$ ,  $n=33$ ,  $p=0,108$ , prueba de Mann-Whitney). También se realizó el análisis porcentual de la posición de las vesículas sinápticas respecto a la zona activa y representándolo en secciones de 10 nm (fig 53E-G). Los resultados pusieron de manifiesto una mayor proximidad de las VSs a la zona activa en los terminales Fmr1 KO y un fuerte aumento del porcentaje de éstas situadas a  $< 10$  nm de la zona activa basal, WT:  $3,68 \pm 0,69\%$ , Fmr1 KO:  $4,81 \pm 0,63\%$ ,  $p=0,076$ , prueba de Mann-Whitney; estimuladas y fijadas a 0 min, WT:  $3,77 \pm 0,51\%$ , Fmr1 KO:  $10,17 \pm 0,82\%$ ,  $p<0,001$ , prueba de Mann-Whitney; estimuladas y fijadas tras 10 min, WT:  $4,44 \pm 0,47\%$ , Fmr1 KO:  $5,46 \pm 0,67\%$ ,  $p=0,43$ , prueba de Mann-Whitney).

# Resultados

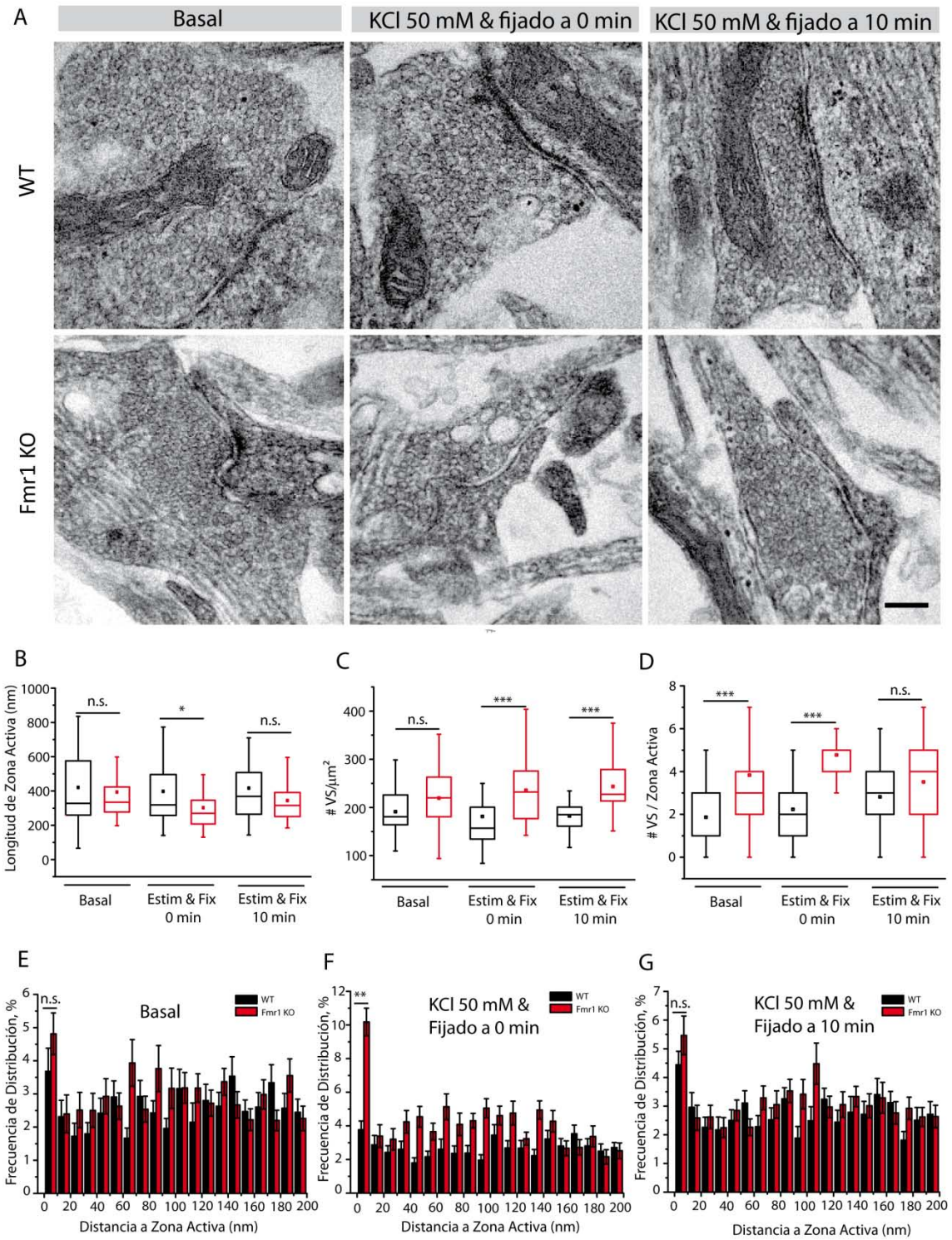


Figura 53: Las neuronas corticales carentes de FMR1 tienen una mayor densidad de VSs y una mayor número de éstas en íntima aposición a la zona activa. A) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de neuronas corticales de cerebro de ratón de genotipo WT (paneles superiores) y Fmr1 KO (paneles inferiores) en situación de reposo (izquierda), estimulados con

## Resultados

KCl 50 mM y fijados inmediatamente (paneles centrales) y estimulados con KCl 50 mM y fijados transcurridos 10 minutos (derecha). Barra de escala 200 nm. B) Gráfico de cajas y bigotes para la longitud de la zona activa en las 3 condiciones experimentales en los dos genotipos (basal, WT n=31; Fmr1 KO n=34, p=0,911, prueba de Mann-Whitney; estimulado y fijado a 0 min, WT n=30; Fmr1 KO n=32, p=0,034, prueba de Mann-Whitney; estimulado y fijado a 10 min, WT n=34; Fmr1 KO n=34, p=0,139, prueba de Mann-Whitney). C) Gráfico de cajas y bigotes para la densidad de VSs ( $VSs/\mu m^2$ ) en las 3 condiciones experimentales (basal, WT n=30; Fmr1 KO n=31, p=0,06, prueba de t de Student; estimulado y fijado a 0 min, WT n=29; Fmr1 KO n=28, p<0,001, prueba de Mann-Whitney; estimulado y fijado a 10 min, WT n=33; Fmr1 KO n=33, p<0,001, prueba de t de Student). D) Gráfico de cajas y bigotes para el número de vesículas amarradas a la zona activa en las diferentes condiciones experimentales. (Basal, WT n=30; Fmr1 KO n=30, p<0,001, prueba de Mann-Whitney; estimulado y fijado a 0 min, WT n=30; Fmr1 KO n=31, p<0,001, prueba de Mann-Whitney; estimulado y fijado a 10 min, WT n=33; Fmr1 KO n=33, p=0,108, prueba de Mann-Whitney). E-G) Cuantificaciones del porcentaje de vesículas por zona activa en función de la distancia por secciones de 10 nm. Se muestran los valores de la media  $\pm$  SEM para el primero de los compartimentos. Basal (E; WT n=30; Fmr1 KO n=31, p=0,076, prueba de Mann-Whitney), estimulada y fijada inmediatamente (F; WT, n=30; Fmr1 KO n=30, p<0,001, prueba de Mann-Whitney) y estimulada y fijada 10 minutos después (G; WT n=33; Fmr1 KO n=33, p=0,43, prueba de Mann-Whitney).

### **5.5.4. Estímulos de corta duración promueven la liberación de una mayor proporción de vesículas recicladas en las neuronas corticales de cerebro de ratón Fmr1KO que en las del ratón WT**

El siguiente objetivo planteado fue estudiar si el tamaño del pool de inmediata liberación (RRP) estaba aumentado en las neuronas Fmr1 KO mediante un ensayo funcional con la sonda FM1-43. Para abordar este estudio, se marcaron los botones sinápticos con la sonda fluorescente FM1-43 y posteriormente se indujo su liberación mediante estímulos de diversa intensidad y duración. En todos los estudios detallados a continuación se analizaron neuronas corticales de cerebro de ratones WT y carentes del gen FMR1.

En primer lugar se analizaron las cinéticas de liberación de FM1-43 en neuronas corticales sometidas a dos estímulos de distinta duración, mediante perfusión de KCl 50 mM (fig 54A). El primero de ellos de 10s de duración, que promoverá la liberación de las vesículas más próximas a la zona activa, y presumiblemente de rápida movilización, y el segundo de ellos, de 2,5 minutos, tras un minuto de perfusión con

## Resultados

HBM de lavado, con el objetivo de liberar el total de la fracción liberable de vesículas (RP). Los resultados mostraron que en neuronas WT de los 2664 botones analizados 13 de ellos (0,49%) no respondieron al primer estímulo, respondiendo únicamente al segundo. Sin embargo, en neuronas Fmr1 KO todos los botones analizados (2723) respondieron a ambos estímulos (fig 54B). Por otra parte, también se observó un fuerte incremento de la fracción de vesículas liberadas (fluorescencia liberada) con el primer estímulo en las neuronas Fmr1 KO frente a WT (fig 54B y C; WT:  $23,41 \pm 0,19\%$ ; Fmr1 KO:  $40,44 \pm 0,27\%$ ,  $p < 0,001$ , prueba de Mann-Whitney). El análisis de la fracción total liberada, al finalizar el segundo estímulo, también mostró un ligero aumento en las neuronas Fmr1 KO (fig 54B y D; WT:  $69,80 \pm 0,18\%$ ; Fmr1 KO:  $74,23 \pm 0,15\%$ ,  $p < 0,001$ , prueba de Mann-Whitney). Los valores de fluorescencia inicial media por experimentos individuales no mostraron diferencias significativas entre ambos genotipos (figura 54E; control:  $1008,34 \pm 94,16$  u.a.; Fmr1 KO:  $921,22 \pm 112,46$  u.a.,  $p = 0,131$ , prueba de t de Student), sugiriendo que aunque el número de vesículas movilizadas por el primer estímulo (carga) es similar en ambos genotipos, el reciclamiento de las mismas es más rápido en las células Fmr1 KO.

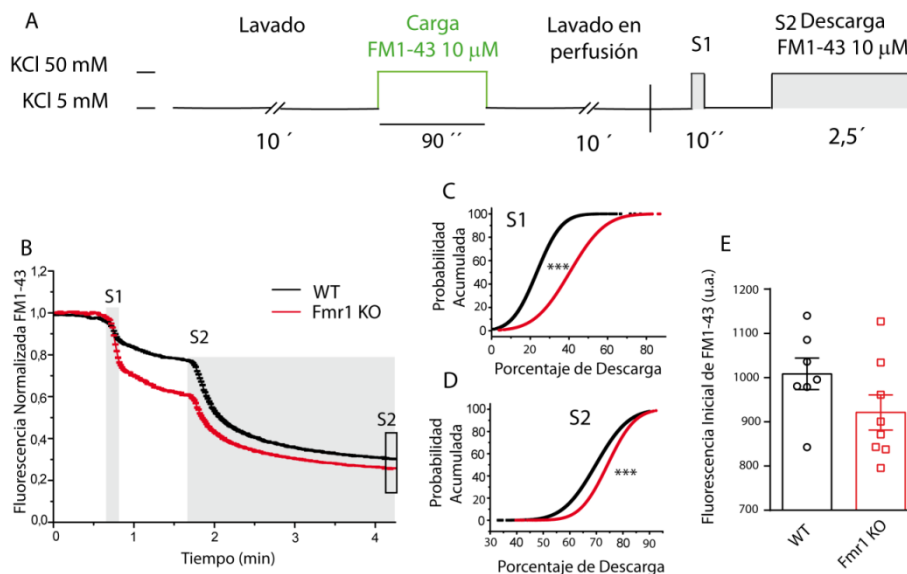


Figura 54: La fracción de VSs de rápida movilización está aumentada en neuronas corticales carentes del gen FMR1 en relación a sus homólogas de genotipo silvestre. A) Esquema de carga y descarga para la sonda fluorescente FM1-43. Se indican mediante S1 y S2 los estímulos de 10 s y 2,5 min respectivamente mediante perfusión de KCl 50 mM para la

## Resultados

liberación de la sonda incorporada. B) Cinética de descarga de FM1-43 inducida mediante la perfusión de KCl 50 mM en S1 y S2. C) Gráfico de probabilidad acumulada para el porcentaje de FM1-43 liberado 1 minuto después del estímulo S1. D) Gráfico de probabilidad acumulada para el porcentaje total de FM1-43 liberada (tras estímulo S2). E) Gráfico de dispersión de puntos para los valores de fluorescencia inicial media por preparación en cada genotipo. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM (WT: n=7; Fmr1 KO: n=8, p=0,131, prueba de t de Student).

Los incrementos de la fracción de fluorescencia liberada no se acompañaron de cambios en las cinéticas ( $\tau$ , constantes temporales) ni durante el estímulo ni en el tiempo transcurrido entre ambos estímulos (tabla 9).

Tabla 9: Valores de las constantes temporales de decaimiento exponencial ( $\tau$ ) en s		
	Neuronas WT	Neuronas Fmr1 KO
Durante S1 ( $\tau$ )	4,61 $\pm$ 0,27 s	4,33 $\pm$ 0,31 s; p=0,5365
Después de S1 asincrónica	27,51 $\pm$ 1,44 s	31,32 $\pm$ 1,97 s; p=0,1695
Durante S2 ( $\tau_1$ y $\tau_2$ )	10,73 $\pm$ 0,26 s	10,58 $\pm$ 0,34 s; p=0,7348
	69,40 $\pm$ 2,55 s	76,37 $\pm$ 2,75 s; p=0,1125

Valores de las constantes temporales de decaimiento exponencial ( $\tau$ ) obtenidas mediante el ajuste de las cinéticas a modelos exponenciales. Las cinéticas durante el estímulo S1 y en su liberación asincrónica posterior fueron ajustadas a un modelo monoexponencial, mientras que las cinéticas durante el estímulo S2 fueron ajustadas a un modelo biexponencial. Los resultados se expresan en segundos, como la media  $\pm$  SEM.

## Resultados

Para analizar con mayor precisión el tamaño del subconjunto vesicular de rápida movilización, utilizamos un protocolo de estimulación eléctrica. Las neuronas corticales, previamente marcadas con FM1-43, se estimularon con 40 PAs a una frecuencia de 20 Hz (fig 55A). Dichas condiciones de estimulación han sido ampliamente utilizadas como estímulo movilizador del RRP en diversos modelos neuronales (Schikorski 2014, Welzel *et al.* 2011, Kaeser & Regehr 2017, Denker & Rizzoli 2010, Rey *et al.* 2015). Tras un minuto de reposo, las neuronas recibieron 900 APs (20 Hz) con objeto de liberar todo el RP. Se observó que algunos botones sólo respondieron al segundo estímulo (fig 55B). Del total de respuestas analizadas en neuronas WT (N=4.882) un 33,94% no respondieron al primer estímulo, mientras que este porcentaje disminuyó en neuronas Fmr1 KO (N=2.400; 27,7%;  $p < 0,0001$ , prueba de Chi-cuadrado). El análisis de la cinética de liberación de FM1-43 (fig 55C) evidenció un aumento significativo del porcentaje de sonda liberada en las neuronas Fmr1 KO frente a WT tras el primer estímulo (fig 55D; WT:  $1,96 \pm 0,09$ ; Fmr1 KO:  $3,19 \pm 0,14$ ,  $p < 0,001$ , prueba de Mann-Whitney). Esta mayor liberación de fluorescencia, se acompañó de una cinética de liberación más rápida durante dicho estímulo (fig 55E). Así mismo, la velocidad de la liberación asincrónica posterior también fue ligeramente mayor (pendiente WT (n=7):  $0,1015 \pm 0,0011$  u.a./s; pendiente Fmr1 KO (n=8):  $0,1103 \pm 0,0012$  u.a./s,  $p < 0,001$ ; prueba de t de student), y por tanto la proporción de fluorescencia liberada tras un minuto del S1 también era mayor en botones de las neuronas Fmr1 KO (fig 55F; WT:  $5,45 \pm 0,07\%$ ; Fmr1 KO:  $6,29 \pm 0,11\%$ ;  $p < 0,001$ , prueba de Mann-Whitney). Sin embargo, cuando se aplicó un estímulo más prolongado (900 APs a 20 Hz) no se observó ningún cambio ni en el porcentaje de sonda liberada (fig 55C) ni en la constante temporal de liberación durante el estímulo ( $\tau_{WT} = 29,83 \pm 1,27$  s y  $\tau_{Fmr1\ KO} = 32,47 \pm 1,65$  s,  $p = 0,2518$ , prueba de t de student).

# Resultados

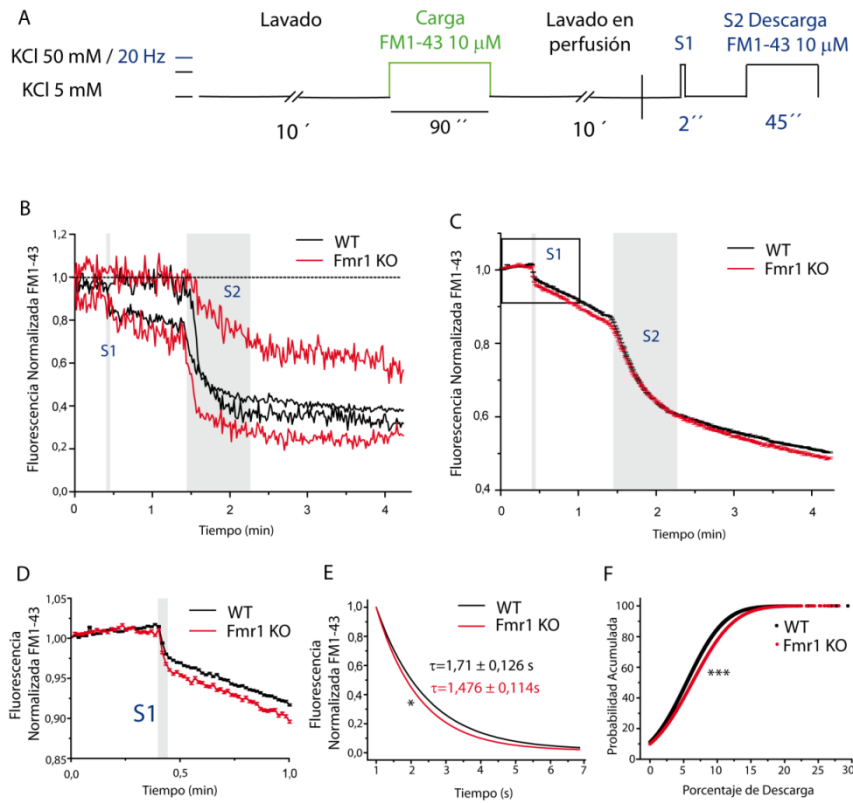


Figura 55: A) Esquema de la carga de FM1-43 mediante estimulación química (KCl 50 mM 90s) y su posterior descarga mediante dos estímulos eléctricos a una frecuencia de 20 Hz 40 PA (S1) y 900 PA (S2). B) Respuestas de botones individuales a los estímulos de 40 APs y 900 APs. C) Cinética de descarga de FM1-43 para los botones WT (N=4882) y Fmr1 KO (N=2400). D) Ampliación de la zona recuadrada en C, se muestran los registros medios de descarga para los dos genotipos WT y Fmr1 KO tras el estímulo S1. E) Cinética de liberación tras el estímulo S1 y la liberación asincrónica posterior ajustada a un modelo monoexponencial. Se muestran insertos los valores medios de  $\tau \pm \text{SEM}$  (WT:  $1,71 \pm 0,126 \text{ s}$ , n=7; Fmr1 KO:  $1,47 \pm 0,11 \text{ s}$ , n=8,  $p < 0,001$ , prueba de t de Student). F) Gráfico de probabilidad acumulada para el porcentaje de descarga de FM1 tras un minuto de S1 en ambos genotipos. Se muestra la media  $\pm \text{SEM}$  (WT: N=3225, n=7; Fmr1 KO: N=1735, n=8 ;  $p < 0,001$ , prueba de Mann-Whitney).

## Resultados

### 5.5.5. Análisis mediante microscopía electrónica de la ultraestructura de rodajas de corteza cerebral en ratones WT y Fmr1 KO en situación de reposo

Finalmente se realizaron estudios de la ultraestructura de la corteza somatosensorial del cerebro (fig 56A). Este tipo de estudio permite esclarecer diferencias ultraestructurales que justifiquen el distinto comportamiento funcional entre ambos genotipos en un modelo que mantiene la complejidad estructural del cerebro y, por tanto, permite el análisis de las sinapsis *in situ*. Para ello, se analizaron secciones coronales de la corteza somatosensorial del cerebro, analizando las sinapsis establecidas por neuronas piramidales de la capa II/III (fig 56A, B).

En primer lugar, se cuantificó la densidad de sinapsis asimétricas (presumiblemente de naturaleza glutamatérgica) como el nº de contactos sinápticos por unidad de superficie (imagen) en ambos genotipos. Las sinapsis asimétricas o de tipo I, de naturaleza glutamatérgica, son fácilmente reconocibles dado que forman contactos axo-dendríticos con una densidad postsináptica muy desarrollada en comparación con las sinapsis simétricas o de tipo II, de naturaleza GABAérgica, las cuales tienden a formar sinapsis de tipo axo-somático (Gray 1959, Colonnier 1968). Para ello, se contabilizó el número total de sinapsis asimétricas en imágenes de MET adquiridas a 25000 aumentos, siendo la totalidad de la imagen una unidad de superficie constante (fig 56B). Los resultados muestran un aumento del número de sinapsis excitatorias por campo en las secciones corticales de Fmr1 KO WT:  $8,50 \pm 0,22$ ; Fmr1 KO:  $9,55 \pm 0,23$ ,  $p=0,002$ , prueba de Mann-Whitney; fig 56C).

Posteriormente, se analizó la ultraestructura de las sinapsis individuales de ambos genotipos adquiriendo imágenes de microscopía electrónica a 80000 aumentos (fig 56D). En primer lugar, se midió la superficie de la sección post-sináptica en las imágenes en las que fue posible (fig 56E), constatando una disminución del valor medio en las secciones Fmr1 KO (en  $\mu\text{m}^2$ ; WT:  $0,212 \pm 0,013$ ; Fmr1 KO:  $0,168 \pm 0,009$ .  $p=0,0017$ , prueba de Mann-Whitney). Por otra parte, se cuantificó la densidad de VSs en los terminales presinápticos de ambos genotipos (fig 56F), encontrándose un mayor número de VSs por unidad de superficie sináptica en el genotipo Fmr1 KO respecto al WT (fig 56F; WT:  $88,06 \pm 3,60$ ; Fmr1 KO:  $105,01 \pm 3,88$ ,  $p=0,002$ , prueba de Mann-Whitney), dato que corrobora lo encontrado en neuronas corticales en cultivo.

## Resultados

Se analizó de forma comparativa entre genotipos las distancias de las VSs a la zona activa. El histograma de distribución de VSs (en porcentaje) respecto a la zona activa (por compartimentos de 10 nm) no mostró cambios significativos entre WT y Fmr1 KO, especialmente en el porcentaje de VSs en los 10 nm más próximos a la zona activa (valores de 0-10 nm expresados como la media  $\pm$  SEM, WT:  $5,64 \pm 0,62\%$ ; Fmr1 KO:  $5,80 \pm 0,39\%$ ,  $p=0,085$ , prueba de Mann-Whitney; fig 56G).

Sin embargo, la cuantificación del número de VS docked mostró un aumento significativo de dicho parámetro en el genotipo Fmr1 KO con respecto al WT (WT:  $1,68 \pm 0,16$ ; Fmr1 KO:  $2,30 \pm 0,17$ ,  $p=0,007$ , prueba de Mann-Whitney; fig 56H). Finalmente, para evaluar si la mayor densidad de VSs en Fmr1 KO guardaba relación con un mayor número de endosomas en neuronas WT, se calculó el cociente endosoma/VS en sendas preparaciones (fig 56I), no encontrándose diferencias en dicho parámetro entre genotipos (WT:  $0,023 \pm 0,003$ ; Fmr1 KO:  $0,016 \pm 0,002$ ,  $p=0,0157$ , prueba de Mann-Whitney).

# Resultados

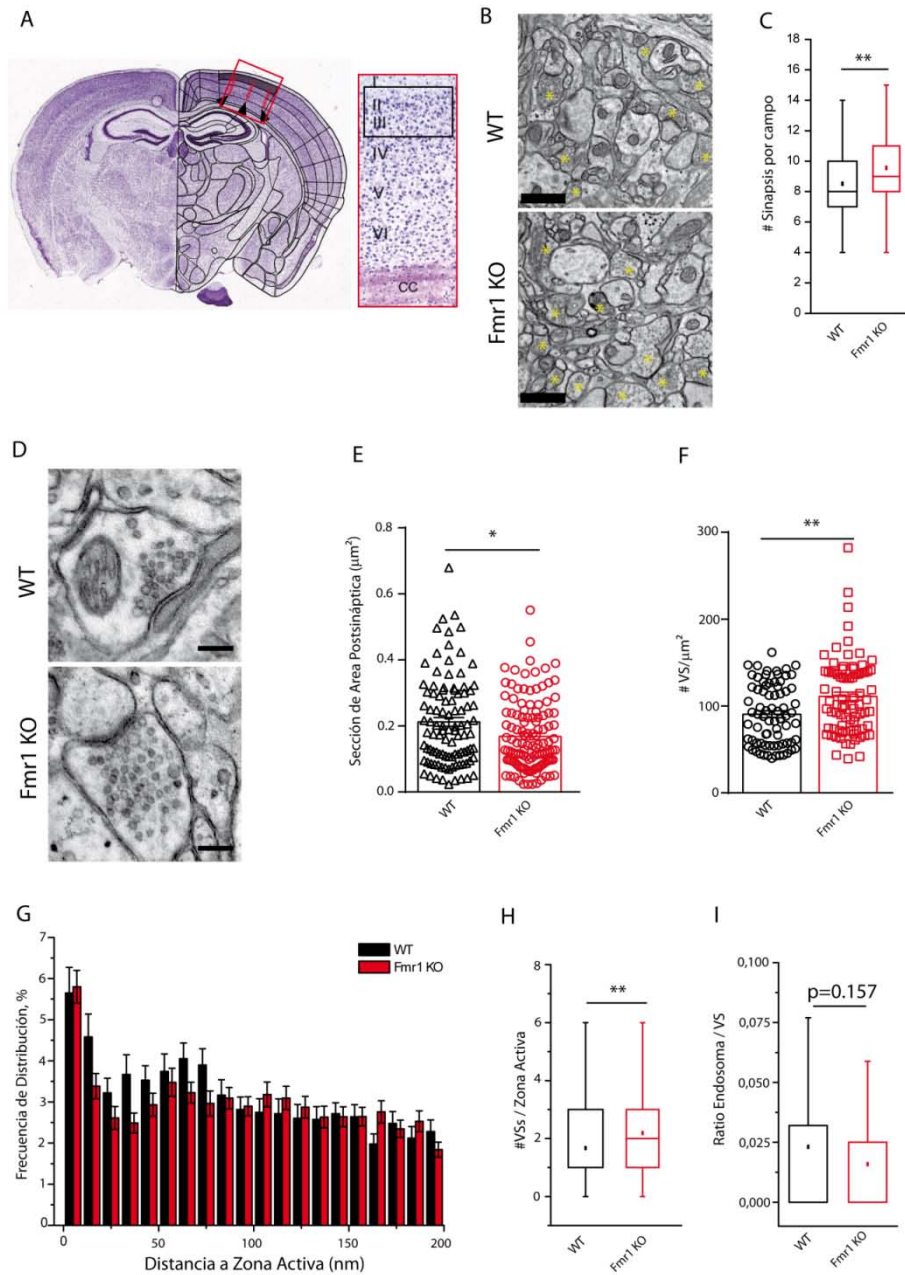


Figura 56: Análisis ultraestructural de las neuronas piramidales de la capa II/III de la corteza somatosensorial de ratón FMR1 KO. A) Izquierda: esquema de sección coronal del cerebro, resaltándose la corteza somatosensorial (recuadro rojo). Derecha: detalle magnificado de la sección recuadrada mostrando las neuronas piramidales de las capas de la corteza somatosensorial. Se indica la capa II/III de la corteza analizada (recuadro negro). B) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión a 25000 aumentos de corteza de ratón WT (panel superior) y Fmr1 KO (panel inferior). Se indica mediante asteriscos amarillos las sinapsis asimétricas. Barra de escala: 1  $\mu\text{m}$ . C) Diagrama de cajas y bigotes para la densidad de sinapsis por campo a 25000 aumentos. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM del  $n^\circ$  VS/ $\mu\text{m}^2$

## Resultados

(WT: n=125; Fmr1 KO: n=126, p=0,002, prueba de Mann-Whitney). D) Micrografías de la ultraestructura de sinapsis de WT (panel superior) y Fmr1 KO (panel inferior) de neuronas piramidales de la capa II/III de la corteza cerebral. Barra de escala 200 nm. E) Gráfico de dispersión con media  $\pm$  SEM para la sección de área postsináptica. Datos mostrados en  $\mu\text{m}^2$  (WT: n=100; Fmr1 KO: n=124, p=0,0179, prueba de Mann-Whitney). F) Gráfico de dispersión para los valores de densidad de VSs ( $\text{VSs}/\mu\text{m}^2$ ). Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM (WT: n=100; Fmr1 KO: n=136, p=0,002, prueba de Mann-Whitney). G) Histograma de distribución de frecuencias porcentuales para la distancia de las VSs a la zona activa por compartimentos de 10 nm. Los resultados se muestran como los valores medios  $\pm$  SEM en los distintos compartimentos, indicándose los valores del primero de los compartimentos. \* indica diferencias significativas (p<0,05) entre WT y Fmr1 KO (WT: n=100; Fmr1 KO: n=136, p=0,085, prueba de Mann-Whitney). H) Gráfico de cajas y bigotes para el número de VSs amarradas a la zona activa (WT: n=100; Fmr1 KO: n=136, p=0,007, prueba de Mann-Whitney). I) Gráfico de cajas y bigotes para el cociente endosoma/Vs (WT: n=100; Fmr1 KO: n=136, p=0,157, prueba de Mann-Whitney).

### 5.5.6. Análisis mediante microscopía electrónica de la ultraestructura de rodajas de corteza cerebral en ratones WT y Fmr1 KO sometidas a estimulación eléctrica

Posteriormente se analizó el efecto de una estimulación eléctrica prolongada y de gran intensidad sobre la ultraestructura de las sinapsis de neuronas piramidales de corteza de ratón. Para ello, se estimularon los somas de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza somatosensorial con un tren de 900 PA a una frecuencia de 20 Hz (fig 57A), un protocolo de estimulación que ha sido extensamente utilizado para la movilización del RP en neuronas hipocampales (Ryan & Smith 1995, Ratnayaka *et al.* 2012, Rey *et al.* 2015). Puesto que las neuronas de la capa V forman contactos sinápticos en la capa II/III, la ultraestructura de las sinapsis se analizó en dicha región (fig 57B).

El análisis de la densidad de VSs mostró, al igual que en la situación de reposo, un notable aumento de dicho parámetro en el genotipo Fmr1 KO (nº de VSs/ $\mu\text{m}^2$ , WT:  $94,13 \pm 4,78$ ; Fmr1 KO:  $116,83 \pm 4,71$ , p<0,001, prueba de Mann-Whitney; fig 57C).

El análisis de las distancias de las vesículas a la zona activa por compartimentos de 10 nm (fig 57D) puso de manifiesto un claro aumento del porcentaje de VSs situadas a < 10 nm de la zona activa (WT:  $4,23 \pm 0,57\%$ ; Fmr1 KO:  $6,67 \pm 0,83\%$ , p=0,002,

## Resultados

prueba de Mann-Whitney). Este resultado se vio acompañado de un aumento del número de VSs amarradas a la zona activa en el genotipo Fmr1 KO con respecto al WT (WT:  $1.62 \pm 0,18$ ; Fmr1 KO:  $3,01 \pm 0,23$ ,  $p < 0,001$ , prueba de Mann-Whitney; fig 57E). Además, se cuantificó la presencia de endosomas como el cociente endosoma/VSS en ambos genotipos (fig 57F), encontrándose un mayor valor de dicho parámetro en el genotipo WT (WT:  $0,039 \pm 0,005$ ; Fmr1 KO:  $0,011 \pm 0,0023$ ,  $p = 0,008$ , prueba de Mann-Whitney).

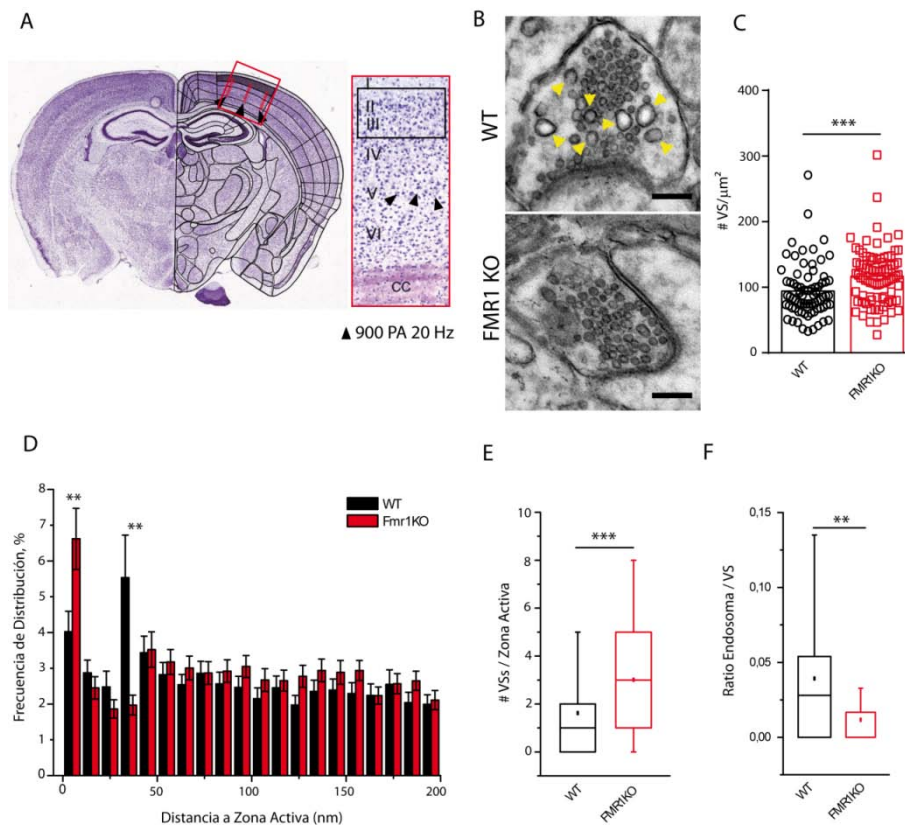


Figura 57: Ultraestructura de las sinapsis de neuronas piramidales de corteza somatosensorial de ratón sometidas a estimulación eléctrica. A) Izquierda: esquema de sección coronal del cerebro, resaltándose la corteza somatosensorial (recuadro rojo). Derecha: detalle magnificado de la sección recuadrada mostrando las neuronas piramidales de las capas de la corteza somatosensorial. Se indica la estimulación de las neuronas piramidales de la capa V con 900 PA a 20 Hz mediante puntas de flecha negra y su proyección hacia las neuronas piramidales de la capa II/III (recuadro negro). B) Micrografías de la ultraestructura de sinapsis de WT (panel superior) y Fmr1 KO (panel inferior) de neuronas piramidales de la capa II/III de la corteza

## Resultados

cerebral estimuladas con 900 PA a 20 Hz. Las puntas de flecha amarillas señalan estructuras endosomales. Barra de escala 200 nm. C) Gráfico de dispersión de puntos con media  $\pm$  SEM para la densidad de VSs ( $\text{VSs}/\mu\text{m}^2$ , WT, n=74; Fmr1 KO: n=83,  $p<0,001$ , prueba de Mann-Whitney). D) Histograma de distribución de frecuencias porcentuales para la distancia de las VSs a la zona activa por compartimentos de 10 nm. Los resultados se muestran como los valores medios  $\pm$  SEM en los distintos compartimentos, indicándose los valores del primero de los compartimentos. \* indica diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre WT y Fmr1 KO (WT: n=74; Fmr1 KO: n=83,  $p=0,002$ , prueba de Mann-Whitney). E) Gráfico de cajas y bigotes para el número de VSs amarradas a la zona activa (WT: n=74; Fmr1 KO: n=83,  $p<0,001$ , prueba de Mann-Whitney). F) Gráfico de cajas y bigotes para el cociente endosoma/VS (WT: n=74; Fmr1 KO: n=83,  $p<0,008$ , prueba de Mann-Whitney).



## VI-Discusión

---

*"Todo nuestro conocimiento arranca del sentido, pasa al entendimiento y termina en la razón"*

Inmanuel Kant



## VI-DISCUSIÓN

### **6.1. La estimulación química libera una mayor proporción de vesículas marcadas con FM1-43 que la estimulación de campo y promueve un reciclamiento más eficiente**

Trabajos anteriores del grupo habían puesto de manifiesto que, cuando se marcaban todas las vesículas del RP con FM1-43 en los botones individuales de neuronas granulares de cerebelo, mediante una estimulación prolongada con KCl 50 mM, y posteriormente se sometían a una estimulación de la misma naturaleza, existía una gran heterogeneidad de respuestas en cuanto a la cinética de liberación y a la cantidad de sonda liberada (Bartolome-Martin *et al.* 2012). Este fenómeno que, presumiblemente, refleja la heterogeneidad de las respuestas de calcio en los botones individuales de estas células (Brenowitz & Regehr 2007), también muestra una gran heterogeneidad en la eficacia de reciclamiento de las vesículas sinápticas en los mismos. Una vesícula se recicla eficazmente si se libera en el primer estímulo (se carga con la sonda) y vuelve a estar disponible para el siguiente estímulo (se descarga de sonda). Los trabajos previos del grupo también habían puesto de manifiesto que, a pesar de la gran heterogeneidad, las respuestas podían segregarse en dos poblaciones (Bartolome-Martin *et al.* 2012). Los botones de “descarga fuerte”, que liberan una mayor proporción de la sonda y, por tanto, su eficacia de reciclamiento vesicular es mayor y los botones de “descarga débil”, que liberan una menor proporción de sonda porque su eficacia de reciclamiento es menor.

El primer objetivo abordado en este trabajo fue analizar si dicha heterogeneidad seguía observándose cuando se reducía la duración (se pasó de 5 ó 3 minutos a 90 segundos) del primer estímulo (utilizado para cargar la sonda) y cómo afectaba a la magnitud y a la cinética de la liberación de FM1-43 la naturaleza del segundo estímulo. Para ello se analizó el efecto de una estimulación química mediante perfusión continua de KCl 50 mM y dos protocolos de estimulación eléctrica, aplicando 2 trenes consecutivos de 900 PA a 20 ó 40 Hz de frecuencia. Los resultados pusieron de manifiesto, por una parte, que se mantenía la heterogeneidad en las respuestas y, por otra, que se producía una mayor liberación vesicular y un aumento, tanto del número de botones funcionales, como del porcentaje de botones de descarga fuerte cuando se empleaba una estimulación química. De hecho, la perfusión de HBM de estimulación finalizada la estimulación eléctrica en ambos protocolos, aumenta la fracción de FM1-

## Discusión

43 liberada. Estos resultados evidencian la necesidad de un estímulo de gran intensidad para liberar la máxima fracción de FM1-43 incorporada en las células granulares de cerebelo (Chadderton *et al.* 2004, Jorntell & Ekerot 2006, Cheung & Cousin 2012) y, por consiguiente, la totalidad del RP, pese a haberse empleado protocolos de estimulación de mayor intensidad que los utilizados en la movilización del RP en neuronas de hipocampo (Ryan & Smith 1995, Ratnayaka *et al.* 2012, Rey *et al.* 2015). Este comportamiento es concordante con el observado *in-vivo*, ya que las neuronas granulares reciben estímulos sostenidos y de elevada intensidad porque en las sinapsis establecidas entre las fibras musgosas y las células granulares se produce una tasa de liberación vesicular elevada y mantenida (Saviane & Silver 2006). Estos datos sumados al hecho de que la estimulación con KCl rinda una mayor densidad de botones funcionales y una mayor proporción de botones de reciclamiento eficiente, sugiere que dichos botones requieren una estimulación de gran intensidad para desencadenar la liberación vesicular (Cheung & Cousin 2012).

### **6.2. El marcaje específico de orgánulos reciclados permite visualizar diferentes modos de reciclamiento vesicular**

Los estudios de microscopía electrónica combinados con el marcaje de los orgánulos reciclados mediante fotoconversión y con diferentes tiempos de fijación (0 y 10 min después del estímulo de carga de la sonda y después de una segunda estimulación para descargar dicha sonda), nos han permitido profundizar en la caracterización de los mecanismos de reciclamiento que operan en neuronas granulares de cerebelo sometidas a estimulaciones de gran intensidad. Cuando la fijación tenía lugar inmediatamente después del cese del estímulo se observaban estructuras de tipo endosomal de gran tamaño y un menor porcentaje de orgánulos reciclados en comparación con lo observado cuando transcurrían 10 minutos entre el estímulo y la fijación. En esta última condición, seguían observándose endosomas, aunque de menor tamaño. Estos datos prueban que los endosomas formados por la endocitosis masiva son procesados, al menos parcialmente, durante los 10 minutos siguientes a la estimulación. La gemación de vesículas, a partir de los mismos, explicaría el aumento del porcentaje de VSs PC<sup>+</sup>, así como la presencia de endosomas PC<sup>+</sup> de menor tamaño. El hecho de que aumenten las VSs PC<sup>+</sup> sin que se altere la ratio endosoma/VSs, es indicativo de que durante el procesamiento de los grandes endosomas pueden formarse varios de menor tamaño. Estos resultados son acordes

## Discusión

con los descritos por el grupo de Cousin, según los cuales la regeneración de VSs tras una estimulación intensa tiene lugar mediante la gemación de éstas a partir de los endosomas previamente formados durante la EM (Cheung & Cousin 2013), siendo este proceso dependiente de dinamina-1 y calcineurina (Ferguson *et al.* 2007, Clayton & Cousin 2009, Clayton *et al.* 2009). El calcio liberado, desde el interior de los endosomas, es el factor desencadenante del proceso al activar secuencialmente a la calcineurina y la dinamina-1 (Cheung & Cousin 2013, Cousin 2015). A su vez, los complejos AP-1 y AP-3, son determinantes para la gemación vesicular a partir de estos endosomas (Cheung & Cousin 2012, Ramperez *et al.* 2017).

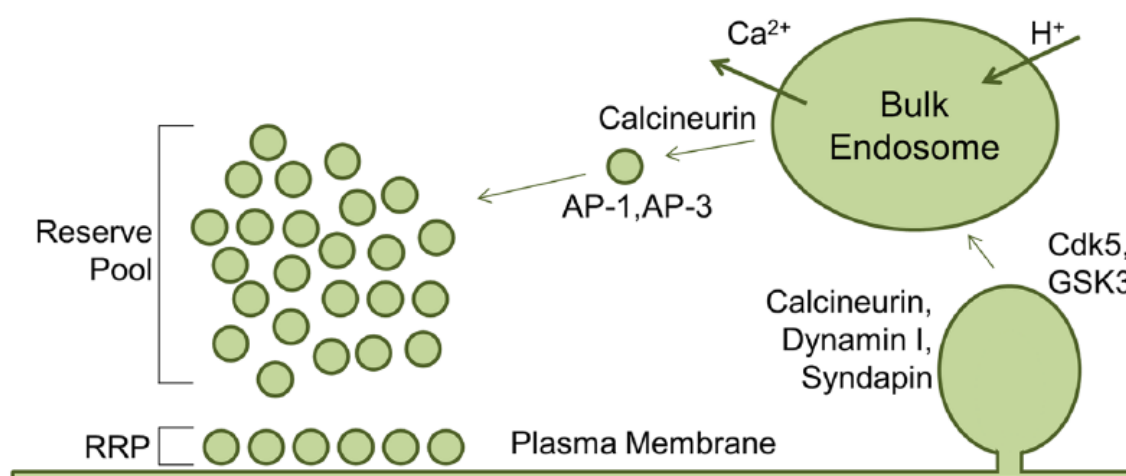


Figura 58: Secuencia de eventos durante la EM desde la formación de los endosomas a partir de la membrana hasta la regeneración de VSs a partir de los mismos. Nótese la participación de los complejos adaptadores AP-1 y AP-3, así como dinamina-1 y calcineurina en la gemación de VSs. Extraído de Cousin *et al.* 2015.

Por otra parte, cuando se llevó a cabo una segunda estimulación antes de la fijación, para inducir la exocitosis de las VSs previamente marcadas, se observó un descenso significativo del porcentaje de orgánulos fotoconvertidos sin que se viese acompañado de una mayor proporción de endosomas (condición "descargado"). Esta condición experimental, emula la fluorescencia final remanente en los experimentos de FM1-43, y demuestra que la heterogeneidad de las respuestas observadas en dichos experimentos tiene aquí su correlato. El hecho de encontrar un descenso significativo

## Discusión

del porcentaje de orgánulos fotoconvertidos, sin que se acompañe de una ratio endosoma/VS mayor puede significar que los endosomas siguen procesándose durante este segundo estímulo. La persistencia de VSs PC<sup>+</sup> en los terminales indica que, si bien las VSs recicladas son preferentemente movilizadas durante una segunda estimulación, el RP no es un compartimento estanco, y éste intercambia VSs con el RtP (Rizzoli & Betz 2005, Fowler & Staras 2015). A este respecto se ha descrito que las vesículas integrantes del RtP presentan "distintivos moleculares" que pueden conferirles diferentes competencias exocitóticas. Este es el caso de VAMP-7, un marcador v-SNARE distintivo del RtP que identifica las vesículas que participan en la exocitosis espontánea (Hua *et al.* 2011). Por otra parte, las VSs que componen el RP portan VAMP-2, un marcador de VSs que participan en la exocitosis evocada (Hua *et al.* 2011). En esta línea, algunos autores atribuyen al pool de reserva una función de "reservorio de proteínas sinápticas" (Denker *et al.* 2011b). Esta configuración, aunque a priori pudiera sugerir una asignación determinista de las VSs a sus respectivos pools, es compatible con la existencia de endosomas de clasificación, en los cuales la fusión de las vesículas con dichos orgánulos propician el intercambio de múltiples proteínas vesiculares (Grant & Donaldson 2009), otorgando a las VSs resultantes un dinamismo para alternar entre el pool de reciclamiento y el de reserva. En consonancia con este modelo, empíricamente se constata que las vesículas PC<sup>+</sup> y PC<sup>-</sup> se entremezclan en el interior de los terminales sinápticos, sin que estas muestren diferencias en la distribución espacial (Rizzoli & Betz 2005, Fowler & Staras 2015). En este proceso juega un papel clave el control dual ejercido por calcineurina y CDK5, al controlar el tamaño relativo del RP/RtP (Kim & Ryan 2010). El sustrato de estas enzimas (entre otros) reside en la familia de las sinapsinas (Benfenati *et al.* 1989b, Akbergenova & Bykhovskaia 2010, Pechstein & Shupliakov 2010). Calcineurina, por su parte, es responsable de la liberación de VSs del RtP para su ingreso en el RP, mientras que CDK5 disminuye el RP en favor del RtP, promoviendo la reasociación de las VSs de este último entre sí y anclándolas al citoesqueleto de actina (Kim & Ryan 2010).

## Discusión

### 6.3. Formas de reciclamiento vesicular en neuronas granulares de cerebelo y dependencia de los complejos adaptadores AP-1/AP-3 y de la dinámica del citoesqueleto de actina

Pese a la dificultad para esclarecer determinantes moleculares de cada población de botones, se han descrito diferencias en el contenido de varias proteínas sinápticas mediante inmunocitofluorescencia realizada después de un experimento de FM1-43 (Ramirez-Franco *et al.* 2013). En este sentido, los botones de descarga fuerte presentan un mayor contenido en calcineurina, Munc-13 y fosfo-sinapsina que los botones de descarga débil, sin que el contenido total de sinapsina estuviera modificado (Bartolome-Martin *et al.* 2012).

A su vez, atendido a la eficacia de reciclamiento, parece lógico plantearse una diferente contribución relativa de los mecanismos de endocitosis que operan en dichos botones. En esta línea, se ha constado una mayor contribución de la EM en los botones de descarga débil (Bartolome-Martin *et al.* 2012, Ramperez *et al.* 2017). Se ha descrito que los mecanismos de EM tienen lugar en sinapsis nacientes, y de forma reminiscente en sinapsis inmaduras (Bonanomi *et al.* 2008), sugiriendo, por tanto, que la mayor contribución de la EM en los botones de descarga débil podría ser indicativo de un estadio más inmaduro de las sinapsis en las que participan. Por el contrario la población de botones de descarga fuerte, donde la EMC parece ser el mecanismo dominante, estarían formando parte de sinapsis más maduras (Granseth *et al.* 2006, Granseth *et al.* 2007). Algunos autores sostienen la hipótesis de la naturaleza saturable de la EMC (Sankaranarayanan & Ryan 2000, Clayton & Cousin 2009), razón por la cual altas frecuencias de estimulación, o estimulaciones de gran intensidad en el presente caso, activan la EM (Cheung & Cousin 2013). En este escenario, la concentración de calcio alcanzada en el interior del terminal es decisivo en la movilización de VSs y en la magnitud de la respuesta exocitótica (Brenowitz & Regehr 2007), promoviendo un mecanismo u otro de reciclamiento vesicular (Kononenko & Haucke 2015) y permitiendo, de este modo, la clasificación de cada botón atendiendo a su reciclamiento vesicular.

Como ya se ha expuesto en la introducción de este trabajo, el reciclamiento vesicular incluye diferentes etapas secuenciales de tráfico intracelular, adquisición de la competencia exocitótica plena por parte de una vesícula sináptica, su fusión con la membrana plasmática y su posterior fisión de esta por endocitosis, así como la reacidificación del lumen vesicular que precede a la reincorporación de nuevas

## Discusión

moléculas de glutamato en su interior (Valtorta *et al.* 1989, Betz & Bewick 1992, Ryan *et al.* 1993, Zimmermann *et al.* 1993, Sudhof 1995, Betz *et al.* 1998, Sudhof 2004). En este proceso, coexisten múltiples formas de reciclamiento asociadas a diferentes estímulos y grados de madurez sináptica, y se ha descrito que la dinámica del citoesqueleto de actina es determinante para muchos de los eventos aludidos anteriormente, habiéndose sugerido que dicha dependencia es mayor en sinapsis más inmaduras.

En el presente trabajo nos propusimos analizar el efecto de la inhibición del reciclamiento vesicular mediado por los complejos adaptadores AP-1/AP-3, así como la dependencia de la dinámica del citoesqueleto de actina de las distintas fases del ciclo vesicular en los botones de neuronas granulares de cerebelo, con objeto de determinar si existen diferencias entre las dos poblaciones de botones anteriormente descritas. La gemación de VSs procedentes de los endosomas formados durante la EM es, en parte, dependiente de los complejos adaptadores AP-1/AP-3 (Faundez *et al.* 1998, Voglmaier *et al.* 2006, Clayton *et al.* 2008, Clayton & Cousin 2009, Korber *et al.* 2012, Cheung & Cousin 2012, Ramperez *et al.* 2017). El reciclamiento vesicular mediado por dichos complejos es independiente de clatrina y sensible a BFA, y se asocia a estadios inmaduros de desarrollo neuronal (Bonanomi *et al.* 2008, Shetty *et al.* 2013) donde la EM es predominante (Bartolome-Martin *et al.* 2012). Por esta razón, parece lógico pensar que una mayor sensibilidad al tratamiento con BFA sea indicativo de sinapsis más inmaduras.

A su vez, el citoesqueleto de actina desempeña un papel decisivo en numerosos procesos presinápticos. Pese a la existencia de múltiples agrupaciones filamentosas en el interior de un terminal, con diferentes funciones y/o grados de estabilidad (Nelson *et al.* 2013), parece evidente que la funcionalidad de dicho citoesqueleto radica en su capacidad de remodelación o dinamismo, más allá de su estado neto de polimerización. A este respecto, se han identificado y caracterizado numerosos fármacos y/o toxinas que afectan al equilibrio de actina, entre los que se encuentran los empleados en este trabajo: JSK y LA (Dos Remedios *et al.* 2003). JSK se comporta como un agente estabilizador de los filamentos de actina, mientras que LA favorece el estado despolimerizado de actina al secuestrar monómeros de G-actina. En este caso, se ha constatado que, pese a su acción farmacológica antagónica, sus efectos sobre la modulación del ciclo vesicular sináptico son con frecuencia coincidentes.

## Discusión

### **6.3.1. La inhibición del reciclamiento vesicular mediado por AP-1/AP-3 y la disrupción del citoesqueleto de actina provocan una disminución del número de botones funcionales**

En primer lugar, se observó que el tratamiento con BFA da lugar a una reducción del número de botones funcionales por unidad de longitud de fibra axónica, pese a que el número total de partículas fluorescentes no difería del control. A la luz de estos hechos, parece razonable pensar que el reciclamiento vesicular de estos botones sea totalmente dependiente de la vía de reciclamiento sensible a BFA. La interpretación de este resultado se basa en el hecho de que aunque dichos botones acumulan fluorescencia durante la carga de la sonda, su retención en endosomas que no generan VSs posteriormente (Perez Bay *et al.* 2007) impide una respuesta exocitótica funcional, razón por la que no son seleccionados para el análisis, al no alcanzar el índice de calidad fijado por el software IgorPro para la identificación de ROIs (Bartolome-Martin *et al.* 2012). Esta población puede estar integrada por botones muy inmaduros, que todavía no han establecido contactos sinápticos con una densidad postsináptica (Hata *et al.* 2007, Korber *et al.* 2012, Shetty *et al.* 2013), o ser sitios de liberación ectópica, cuya presencia se ha demostrado, mediante técnicas fluorimétricas, en las fibras paralelas (Matsui & Jahr 2003, Matsui *et al.* 2005). Dichos sitios de liberación se deprimen ante una estimulación repetida por la imposibilidad de reciclar VSs en un corto intervalo de tiempo (Balakrishnan *et al.* 2011), contribuyendo de este modo a una disminución de la densidad de botones funcionales. A este respecto, en los análisis ultraestructurales de CGCs realizados, se ha constatado empíricamente la aparición ocasional de acumulaciones de VSs en regiones de fibras axónicas sin establecer contacto con una densidad postsináptica, tratándose presumiblemente de sinapsis nacientes inmaduras o sitios de liberación ectópica que experimentan exo-endocitosis dependiente de actividad (Hata *et al.* 2007).

Por otra parte, el citoesqueleto de actina desempeña un papel clave en la formación y mantenimiento de sinapsis, fundamentalmente en estadios inmaduros (Zhang & Benson 2001). De acuerdo con esto, se observó que los tratamientos con LA y JSK disminuían la densidad de botones funcionales en nuestra preparación. Estudios de proteómica han revelado la existencia de dos tipos de formaciones de actina filamentosa: una asociada a la zona activa, conocida como "actina cortical" y otra asociada a las VSs que integran los pools de reserva y de reciclamiento (Nelson *et al.* 2013). La reducción del número de botones funcionales observada en los estudios con

## Discusión

FM1-43 y con el inmunomarcaje de sinaptotagmina y Bassoon puede explicarse, en parte, por la pérdida de integridad de la zona activa (Gundelfinger *et al.* 2015), la dispersión de las VSs o por ambas. Los resultados de inmunofluorescencia frente a Bassoon mostraron una disminución de la intensidad de marcaje para Bassoon tras la incubación con JSK y LA. Dicha proteína es uno de los componentes de la citomatriz de la zona activa (Dresbach *et al.* 2001, Dresbach *et al.* 2003), por lo que la disminución de su inmunorreactividad sugiere la desestructuración de la zona activa. Al igual que lo observado en este trabajo, estudios realizados por el grupo de Richards confirman que la desorganización del citoesqueleto de actina no altera de forma significativa el grado de agrupamiento vesicular, tanto en condiciones de reposo como tras una estimulación (Richards *et al.* 2004). Sin embargo no puede descartarse una dispersión de VSs como consecuencia de la despolimerización del citoesqueleto de actina en botones más inmaduros o sinapsis nacientes, que escaparían al análisis de microscopía electrónica. Otra interpretación plausible al descenso del número de botones funcionales observado con los tratamientos con JSK y LA es la inhibición completa de la exo-/endocitosis en una subpoblación de botones sinápticos. Esta hipótesis está de acuerdo con el efecto de LA y JSK cuando el tratamiento se realiza previo a la carga de FM1-43, donde la menor cantidad de sonda acumulada puede deberse a que el bloqueo de la dinámica del citoesqueleto de actina afecte a la formación de nuevos filamentos implicados tanto en mecanismos endocíticos (Akbergenova & Bykhovskaia 2009, Nguyen *et al.* 2012, Watanabe *et al.* 2013b, Wu *et al.* 2016, Li *et al.* 2016) como a la translocación de VSs a la membrana plasmática para la exocitosis (Kuromi & Kidokoro 1998, Sakaba & Neher 2003, Rust & Maritzen 2015). En este sentido, la disminución de la densidad de botones funcionales acaecida como resultado de la disrupción de la dinámica del citoesqueleto de actina se debe a una ausencia de marcaje de dichos botones en contraposición a la falta de funcionalidad de éstos como se ha constado con el tratamiento con BFA.

Estos resultados, en su conjunto, evidencian la existencia de una población de botones muy inmaduros cuyo reciclamiento vesicular es sensible a la interferencia con la dinámica de polimerización-despolimerización de actina y a la inhibición de los complejos AP-1/AP-3. Presumiblemente se trata de la misma población de botones aunque no disponemos de datos experimentales que nos permitan afirmarlo de manera fehaciente.

## Discusión

### **6.3.2. En los botones de descarga débil la interferencia con la dinámica del citoesqueleto de actina afecta a la endocitosis y el reciclamiento vesicular es sensible a la inhibición de los complejos AP-1/AP-3**

Utilizando FM1-43 para analizar el ciclo vesicular e inhibiendo los complejos adaptadores AP-1/AP-3 con BFA, antes ó después de la carga de la sonda, evidencian que dicho tratamiento afecta diferentes procesos del ciclo vesicular en CGCs de 7-8 DIV (Ramperez *et al.* 2017). En primer lugar, la incubación con BFA previa al estímulo conducente a la carga de FM1-43 dio lugar a un menor marcaje de los terminales sinápticos, cuantificado en términos de intensidad de fluorescencia, un fenómeno más acusado en la población de botones de descarga débil (botones que se caracterizan por tener una mayor fluorescencia inicial que los de descarga fuerte). La disminución de la fluorescencia observada puede deberse, en primer lugar a una disminución del número de vesículas liberadas por el estímulo utilizado para cargar la sonda. Sin embargo, una inhibición de la formación de endosomas, mediada por los complejos AP-1/AP-3, a nivel de la membrana plasmática (Voglmaier *et al.* 2006), también se traduciría en una disminución de la fluorescencia aunque no se modificase el número de vesículas exocitadas. Así mismo, un retraso en la retracción de la membrana con la persistencia de estructuras endocíticas abiertas durante el periodo de lavado, que permitiese la disociación de la sonda, o una mayor degradación de los endosomas por vía lisosomal, también explicarían la menor intensidad de fluorescencia observada. La inhibición de la exocitosis puede descartarse ya que, cuando BFA se añadió 5 min después de la carga de FM1-43, no se observó inhibición de la liberación de la sonda cuando las células fueron nuevamente estimuladas. Así mismo, tampoco, se observó inhibición de la exocitosis cuando se empleó el reportero genético vGluT1-pHluorina en combinación con bafilomicina A1, que al inhibir la ATP-asa vacuolar e impedir la reacidificación vesicular permite monitorizar una acumulación de la fluorescencia, reflejo de la exocitosis total (Sankaranarayanan & Ryan 2001, Burrone *et al.* 2006). Por esta razón, parece más razonable pensar que la inhibición de los complejos AP-1/AP-3 por la BFA interfiera con la invaginación y gemación de fragmentos de membrana (Park *et al.* 2016). Otro fenómeno que podría explicar esa menor fluorescencia sería la degradación de endosomas en los terminales sinápticos, que, aunque no se dispone de evidencias experimentales de que esto ocurra, se ha sugerido que dicha degradación pueda suceder en determinadas circunstancias (Cousin 2015). En nuestro modelo de estudio, un aumento de la degradación de endosomas podría justificar la disminución de fluorescencia observada en las células tratadas con BFA,

## Discusión

fenómeno que no podemos descartar con ninguna de las aproximaciones experimentales utilizadas en este trabajo. En la ME se observaron más endosomas en las células tratadas con BFA y fijadas inmediatamente después de la estimulación que en aquellas que se fijaron transcurridos 30 minutos desde la misma. La incapacidad de su procesamiento para la gemación de VSs, al inhibirse el reclutamiento de AP-1 y AP-3, favorecería la fusión con los endosomas de reciclaje, maduración a endosomas tardíos y degradación por la vía lisosomal (Grant & Donaldson 2009).

Añadido al hecho de la disminución de la fluorescencia, las cinéticas de descarga de FM1-43 en los botones tratados con BFA mostraron un enlentecimiento de las mismas, y los estudios de ultraestructura evidenciaron un aumento del cociente endosoma/Vs en detrimento del número y densidad de éstas en las sinapsis tratadas con BFA. Esos datos son consistentes con la activación de la EM (Clayton *et al.* 2008, Cheung & Cousin 2012) y con el hecho de que la gemación de VSs a partir de los endosomas previamente formados es dependiente de los complejos AP-1 y AP-3, sensibles a BFA (Blumstein *et al.* 2001b, Voglmaier *et al.* 2006).

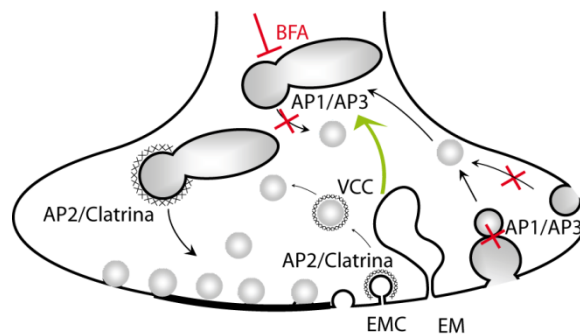


Figura 59: Modelo gráfico del mecanismo de actuación de BFA sobre el reciclamiento vesicular sináptico cuando se administra previo a una estimulación intensa. La inhibición del reciclamiento vesicular mediado por los complejos adaptadores AP-1 y AP-3 da lugar a un menor marcaje vesicular e impide, al menos parcialmente, la gemación de VSs de los endosomas previamente formados por la vía dependiente de AP-1/AP-3.

El protocolo de estimulación empleado en estos estudios desencadena tanto la EMC como la EM (Cheung & Cousin 2012, Cheung & Cousin 2013), siendo la vía de reciclaje mediada por AP-1 y AP-3 un segundo mecanismo independiente de

## Discusión

regeneración de VSs, a partir de los endosomas, en paralelo a la EMC (Zakharenko *et al.* 1999, Korber *et al.* 2012). Dada la coexistencia de ambas vías de reciclamiento en los terminales sinápticos, parece evidente el planteamiento de un efecto competitivo entre ambos que, en última instancia, module la velocidad y la magnitud del reciclamiento vesicular (Voglmaier *et al.* 2006, Foss *et al.* 2013).

Con el fin de dilucidar el efecto de BFA sobre la fase exocitótica del ciclo vesicular, se realizaron estudios funcionales de liberación de FM1-43 en los cuales el tratamiento farmacológico tuvo lugar posterior al paso de carga de la sonda. Como se ha discutido previamente, en esta situación no se produce una disminución de la intensidad de fluorescencia de FM1-43, sino que paradójicamente se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia de FM1-43 al inicio del periodo monitorizado, acompañado de un aumento de la densidad de botones funcionales. En este caso, y puesto que la carga de la sonda tuvo lugar previo al tratamiento con BFA, se descarta que dicho efecto pueda estar motivado por diferencias en la respuesta exocitótica (Kuromi & Kidokoro 1999). Por esta razón, parece razonable pensar que la diferente intensidad de fluorescencia se deba a un mayor grado de empaquetamiento de las VSs como resultado del tratamiento con BFA. Siguiendo el mismo planteamiento, la mayor densidad de botones funcionales encontrados ha de interpretarse en términos de una mayor efectividad de las respuestas exocitóticas como se discute más adelante.

La posterior estimulación conducente a la descarga de la sonda, pese a no modificar sustancialmente la fracción de sonda liberada, sí evidenció una mayor velocidad de liberación de la misma, tal como muestran los valores de las constantes temporales de decaimiento exponencial ( $\tau_1$  y  $\tau_2$ ), especialmente en la población de botones de descarga débil. Estos efectos se acompañan de un correlato estructural en los análisis de microscopía electrónica, en los que se observa una aproximación neta de las VSs a la zona activa. A su vez, los análisis de ultraestructura no mostraron alteraciones en el número ni en el tamaño de los endosomas. Este hecho evidencia, por una parte, que los endosomas formados son procesados, al menos parcialmente, en dicho intervalo de tiempo, generando vesículas por gemación, presumiblemente por la vía AP-2/clatrina-dependiente (Kononenko *et al.* 2014), y por otra parte, que la eficiencia con la que este proceso tiene lugar no se modifica por el tratamiento con BFA. A este respecto, se ha descrito que los diferentes pools vesiculares son reciclados a través de distintas vías (Danglot & Galli 2007), siendo el RtP preferentemente reciclado mediante EM (Rizzoli & Betz 2005), mientras que la gemación de VSs por la vía AP-

## Discusión

2/clatrina-dependiente rinde VSs funcionalmente competentes para una nueva ronda de estimulación (Kononenko *et al.* 2014).

A la vista de estos resultados, parece evidente que el tratamiento con BFA posterior a una primera estimulación intensa y prolongada ocasiona una reorganización de los pools vesiculares, concentrando las VSs en posiciones más próximas a la zona activa y promoviendo una respuesta exocitótica de mayor magnitud y velocidad (Li & Murthy 2001) (fig 60).

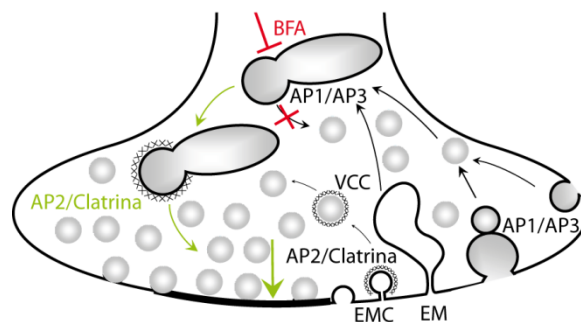


Figura 60: Esquema del mecanismo de actuación de BFA en la modulación de la respuesta exocitótica cuando es administrada después de una estimulación intensa con KCl 50 mM. La inhibición del procesamiento endosomal mediado por AP-1/AP-3 activa la gemación de VSs por la vía AP-2/clatrina-dependiente, dando lugar a VSs del RP que se situarán próximas a la zona de liberación.

El hecho de que el tamaño del pool de reciclamiento, estimado mediante estimulación de dichas neuronas en presencia de bafilomicina-A1 (Ramirez-Franco *et al.* 2014), no se vea modificado como resultado de la incubación con BFA, es consistente con la hipótesis de que el tratamiento con BFA previo a una estimulación intensa genera una redistribución de las VSs. La reorganización vesicular observada cuando el tratamiento con BFA se realiza después de una estimulación intensa es compatible con un cambio en la vía de reciclaje vesicular a partir de los endosomas previamente formados, de tal forma que las VSs puedan ser regeneradas por la vía AP-2/clatrina-dependiente (Kononenko *et al.* 2014) en vez de mediar los complejos AP-1/AP-3 (Blumstein *et al.* 2001a, Voglmaier *et al.* 2006). De hecho, se ha descrito que diferentes pools vesiculares parecen derivar de distintas rutas de reciclamiento (Voglmaier *et al.* 2006, Danglot & Galli 2007) siendo el RtP preferentemente reciclado por mecanismos de EM

## Discusión

(Rizzoli & Betz 2005). A pesar de que se trata de un aspecto controvertido, numerosos trabajos coinciden en señalar que el terminal sináptico es capaz de alternar entre diferentes vías de reciclamiento en función de los requerimientos dictados por la propia actividad sináptica (Micheva & Smith 2005, Granseth *et al.* 2006, Renden & von Gersdorff 2007, Watanabe *et al.* 2013b, Kononenko *et al.* 2013). A tal respecto, recientemente, Schikorski y colaboradores han descrito que el RRP utiliza múltiples mecanismos endocitóticos tras la exocitosis (Schikorski 2014).

Por otra parte, en los experimentos en los que se emplea vGluT1-pHluorina los datos cinéticos de exocitosis y endocitosis durante la estimulación (KCl 50 mM 10s) ponen de manifiesto que si bien la velocidad de exocitosis no se modifica como resultado del tratamiento con BFA, la cinética endocitótica sí se acelera ligeramente. En este escenario, el empleo de una estimulación intensa (KCl 50 mM), pero de menor duración (10s) que en los experimentos de FM1-43 corrobora un cambio en los mecanismos de reciclaje vesicular previamente aludidos, presumiblemente reflejando un mayor protagonismo de la vía de endocitosis mediada por AP-2 y clatrina capaz de satisfacer las demandas del reciclamiento vesicular sin alcanzar su saturación (Sankaranarayanan & Ryan 2000, Clayton & Cousin 2009), y traduciéndose en un perfil más rápido cuando se emplean técnicas de imagen con pHluorinas (Granseth *et al.* 2006, Granseth *et al.* 2007).

Los experimentos con FM1-43 ponen de manifiesto una mayor sensibilidad al tratamiento con BFA de los botones de descarga débil en comparación con la población de botones de descarga fuerte, cuyo comportamiento apenas se ve modificado. A pesar de no conocerse detalladamente el mecanismo molecular que subyace a la diferente sensibilidad al tratamiento con BFA, distintas proporciones en el contenido de AP-1/AP-3 en relación a AP-2 en los diferentes botones sinápticos podrían justificarla.

En la población de botones de descarga débil, la disrupción de la dinámica del citoesqueleto de actina, tanto favoreciendo la estabilización de los filamentos como su despolimerización, redujo significativamente la fluorescencia incorporada durante el estímulo de carga. Este parámetro refleja el número de vesículas u otros orgánulos endocíticos marcados y, aunque la disminución de fluorescencia pueda reflejar una inhibición de la exocitosis, el hecho de que no se afecte la fluorescencia liberada cuando la incubación con los fármacos se lleva a cabo después de la carga descarta que el efecto sea sobre la exocitosis. Un defecto endocitótico también daría como

## Discusión

resultado un menor número de vesículas marcadas y la participación del citoesqueleto de actina en diferentes procesos endocitóticos se ha descrito en numerosos trabajos (Akbergenova & Bykhovskaia 2009, Dillon & Goda 2005, Fenster *et al.* 2003, Kaksonen *et al.* 2003, Kuromi & Kidokoro 1998, Merrifield *et al.* 1999, Nguyen *et al.* 2012, Richards *et al.* 2004, Watanabe *et al.* 2013b, Wu *et al.* 2016). En este sentido, la inhibición de la endocitosis puede también ocasionar una reducción de la fluorescencia inicial de los botones de descarga débil como resultado de la alteración del equilibrio de la dinámica del citoesqueleto de actina previa a la carga de la sonda. Como ya se ha mencionado anteriormente, la EMC y la EM activada por una estimulación intensa y prolongada, tal y como atestigua la presencia de endosomas en numerosas sinapsis, contribuyen al reciclamiento de membrana en estos botones (Bartolome-Martin *et al.* 2012, Ramperez *et al.* 2017). Ambos mecanismos requieren de la tensión mecánica ejercida por el citoesqueleto de actina para la invaginación y fisión del orgánulo a internalizar (Holt *et al.* 2003, Richards *et al.* 2004, Soykan *et al.* 2017, Wu *et al.* 2016), por lo que la inhibición de cualquiera de estos mecanismos explicaría los resultados obtenidos.

La EM tiene lugar durante la estimulación (Nguyen *et al.* 2012), y una vez concluida ésta, la EMC pasa a ser la forma dominante de endocitosis (Clayton & Cousin 2009). Por esta razón, y de acuerdo con nuestro diseño experimental, si la internalización por EM o la maduración de los endosomas estuviese comprometida por la disrupción de la dinámica del citoesqueleto de actina, la EMC asincrónica podría internalizar VSs recicladas PC<sup>-</sup> como resultado del lavado posterior de las membranas, dando lugar a un menor número de endosomas marcados en dichas sinapsis. Sin embargo, ni el número de endosomas PC<sup>+</sup> ni su distribución en las sinapsis analizadas es diferente tras el tratamiento con JSK o LA, pese a la menor proporción de organelas PC<sup>+</sup>. En este contexto, y pese a que no se puede descartar un procesamiento más eficiente de los endosomas formados en la condición control ya que no se analizó el tamaño de los mismos, los resultados también son compatibles con la inhibición de la EMC dada su dependencia con la dinámica del citoesqueleto de actina (Grassart *et al.* 2014, Rust & Maritzen 2015, Wu *et al.* 2016). Por esta razón, la incubación de las células con los fármacos previo a la carga de FM1-43 contribuye a la disminución de la fluorescencia inicial en los botones de descarga débil y de la proporción de VSs PC<sup>+</sup>.

## Discusión

### **6.3.3. En los botones de reciclamiento vesicular eficiente la dinámica del citoesqueleto de actina es necesaria para la exocitosis y el reciclamiento vesicular es poco dependiente de AP-1/AP-3**

Diversos estudios han sugerido que la red de actina que envuelve a las vesículas actúa a modo de "barrera" para la movilización vesicular del RtP (Wang *et al.* 1996). Por tanto, la desestructuración de dicha barrera podría dar lugar a un incremento de la liberación vesicular (Sankaranarayanan *et al.* 2003, Richards *et al.* 2004, Morales *et al.* 2000). En neuronas granulares de cerebelo transfectadas con vGluT1-pHluorina y sometidas a una estimulación de gran intensidad se ha constatado empíricamente, un aumento de la liberación no evocada como resultado del tratamiento con LA, sugiriendo que la despolimerización del citoesqueleto de actina favorece dicho proceso. Sin embargo, y pese a la existencia de una gran heterogeneidad en la susceptibilidad individual de los botones sinápticos al tratamiento con LA, la liberación vesicular absoluta no se ve incrementada tras la estimulación. Los resultados obtenidos con vGluT1-pHluorina o con FM1-43 en célula viva y/o combinados con microscopía electrónica, así como el inmunomarcaje frente sinaptotagmina luminal revelaron un menor marcaje vesicular en los botones previamente tratados con JSK o LA, poniendo de manifiesto una inhibición de la exocitosis.

En este sentido, cuando se analizó el efecto del tratamiento de las células con JSK o LA en la respuesta a dos estímulos consecutivos en neuronas transfectadas con vGluT1-pHluorina, dichas respuestas fueron menores que en las células no tratadas. Como se ha descrito previamente, el uso de pHluorinas codificadas genéticamente presenta la ventaja de no requerirse una estimulación previa para el marcaje de los botones (Kavalali & Jorgensen 2014), descartando así la posible influencia de la endocitosis en el proceso. La incubación con LA se tradujo en una fuerte inhibición de la respuesta exocitótica a ambos estímulos, y pese a que la constante temporal de decaimiento exponencial ( $\tau$ ) de la recuperación de la línea base tras el primer estímulo fue sensiblemente inferior, esta recuperación no cambió durante y/o después del final del segundo estímulo. Por esta razón, se puede concluir que las respuestas más débiles se deben fundamentalmente a una inhibición de la exocitosis. Así mismo, el tratamiento con JSK también redujo la respuesta exocitótica a ambos estímulos sin afectar a las constantes temporales ni la velocidad de recuperación de la línea base.

En paralelo a estos hechos, el tratamiento farmacológico con JSK o LA cinco minutos después del periodo de carga de FM1-43 ocasionó una disminución acusada del

## Discusión

porcentaje de botones de descarga fuerte con ambos tratamientos farmacológicos, así como una clara disminución de la cantidad de sonda liberada en las neuronas tratadas con LA. Debido al hecho de que la segregación de botones en las dos poblaciones está basada en su grado de descarga (Bartolome-Martin *et al.* 2012), la disminución del porcentaje de botones de descarga fuerte indica la inhibición de la liberación de FM1-43 en una subpoblación de dichos botones, indicando que la estabilización de actina, y en definitiva, la alteración del dinamismo del citoesqueleto de actina, inhibe la liberación vesicular tal y como ha sido descrito en otras sinapsis (Wang *et al.* 1996, Wolf *et al.* 2015). En este sentido, los análisis de ultraestructura evidencian un menor porcentaje de VSs fotoconvertidas en los botones cuando JSK es administrada antes de la carga, pero no así cuando la incubación tiene lugar después de la carga de FM1-43. El tráfico de las vesículas recicladas en el interior de los terminales sinápticos es dependiente de los filamentos de actina, necesarios para el correcto posicionamiento y la translocación de VSs en la sinapsis (Wolf *et al.* 2015, Geng *et al.* 2016), tal y como se evidencia en el alejamiento de las VSs PC<sup>+</sup> respecto a la ZA en células tratadas con LA. Por otra parte, a partir de nuestros resultados se infiere una susceptibilidad diferente de la exocitosis a la estabilización de los filamentos de actina en los diferentes botones dependiendo de su historia previa de actividad, que podría justificar por qué JSK disminuye la proporción de botones de descarga fuerte cuando el tratamiento se realiza después de la carga de la sonda y disminuye el número total de botones funcionales cuando dicho tratamiento es previo al estímulo conducente a la carga.

Por otra parte, se observó que los botones de descarga fuerte experimentaban una menor dependencia del reciclamiento vesicular mediado por AP-1/AP-3 que los botones de descarga débil. Esta conclusión se basa en el hecho de que la incubación con BFA previo a la carga de FM1-43 disminuyó en menor proporción los valores de fluorescencia inicial que en los botones de descarga débil, poniendo de manifiesto una menor dependencia de los complejos AP-1/AP-3 durante la endocitosis. A su vez, y a diferencia de los botones de descarga débil, las subsiguientes cinéticas de liberación de FM1-43 en dicha población de botones no mostró cambios en las cinéticas con respecto a la condición control (Ramperez *et al.* 2017), sugiriendo que la disponibilidad de VSs del rápida movilización ( $\tau_1$ ) y las VSs de liberación más tardía o del RP ( $\tau_2$ ) no se ve comprometida por el tratamiento con BFA. A partir de estos resultados se puede concluir que los botones de descarga fuerte son menos dependientes del reciclamiento vesicular sensible a BFA, y en consonancia con esto muestran un mayor estado de

## Discusión

maduración funcional de acuerdo a evidencias experimentales previas (Hata *et al.* 2007, Korber *et al.* 2012, Shetty *et al.* 2013). Esta mayor maduración funcional está relacionado con el papel que juegan las moléculas de adhesión celular NCAM en correcto establecimiento de sinapsis funcionales, las cuáles favorecen el reciclamiento vesicular mediado por AP-2 y clatrina en detrimento del reciclamiento AP-1/AP-3 dependiente (Shetty *et al.* 2013), relegando de este modo el reciclamiento vesicular menos eficiente mediado por AP-3 (Voglmaier *et al.* 2006) a los estadios mas inmaduros (Polo-Parada *et al.* 2001).

### **6.4. Coexistencia de sinapsis en diferentes estadios de maduración en neuronas granulares de cerebelo *in vivo* y posibles implicaciones fisiológicas**

En este trabajo, así como en trabajos previos del grupo, se han estudiado diversas vías de señalización y mecanismos moleculares que subyacen a la diferente eficiencia de reciclamiento vesicular observado en los botones sinápticos de neuronas granulares. Como ya se ha discutido previamente, en primer lugar nuestros resultados muestran que hay una población de botones, que escapan al análisis, cuyo reciclamiento es estrictamente dependiente de los complejos AP1/AP-3 (Ramperez *et al.* 2017) (fig 61), representando, presumiblemente, la fracción más inmadura de botones sinápticos (Bonanomi *et al.* 2006, Hata *et al.* 2007, Korber *et al.* 2012, Shetty *et al.* 2013).

También se ha sugerido que el reciclamiento vesicular es más dependiente del citoesqueleto de actina cuanto más inmadura es la sinapsis (Zhang & Benson 2001). Los resultados presentados en esta tesis en relación a la alteración de la dinámica del citoesqueleto de actina muestran que dicha dependencia existe en todos los botones sinápticos, aunque no se vean afectadas las mismas etapas del ciclo ni que el grado de dependencia sea el mismo en todos ellos. En este sentido, la disminución de botones funcionales observada por el tratamiento con JSK y LA, indica que existe una fracción de botones muy inmaduros, que podría coincidir con aquellos que tienen una dependencia casi absoluta de la EM (Ramperez *et al.* 2017), ya que el citoesqueleto de actina y la miosina tienen gran protagonismo en dicho proceso, tanto en la invaginación e internalización de los endosomas (fig 62B) (Kavalali 2006, Gormal *et al.* 2015) como en la posterior gemación de las VSs a partir de éstos (fig 62A) (Nguyen *et*

## Discusión

*al.* 2012). Por esta razón, la desestabilización del citoesqueleto de actina, así como el bloqueo de la gemación de VSs por la vía dependiente de AP-1/AP-3 (Korber *et al.* 2012, Ramperez *et al.* 2017) compromete el procesamiento de dichos orgánulos e impide una respuesta funcional posterior.

En los botones de descarga débil, se produce una mayor liberación de VSs en respuesta a una primera estimulación que favorece una mayor contribución de la EM, y un reciclamiento más lento (Bartolome-Martin *et al.* 2012). Los resultados obtenidos mediante la inhibición de los complejos adaptadores AP-1/AP-3 sobre el reciclamiento vesicular son acordes con este modelo. Se ha constatado una mayor sensibilidad a dicha inhibición en la población de botones de descarga débil, que pueden representar la fracción más inmadura de botones sinápticos analizados (Bartolome-Martin *et al.* 2012, Collado-Alsina *et al.* 2014, Ramperez *et al.* 2017). En estos botones es necesaria la tensión mecánica aportada por el citoesqueleto de actina tanto para la formación de los endosomas como para su maduración y la gemación de nuevas vesículas a partir de los mismos (Nguyen *et al.* 2012, Gormal *et al.* 2015). Por esta razón, y dada la alta demanda de actina y de su capacidad de remodelación de los filamentos en esta situación, parece evidente que en dichos botones la endocitosis muestre una mayor sensibilidad a la disrupción de la dinámica del citoesqueleto de actina (fig 61).

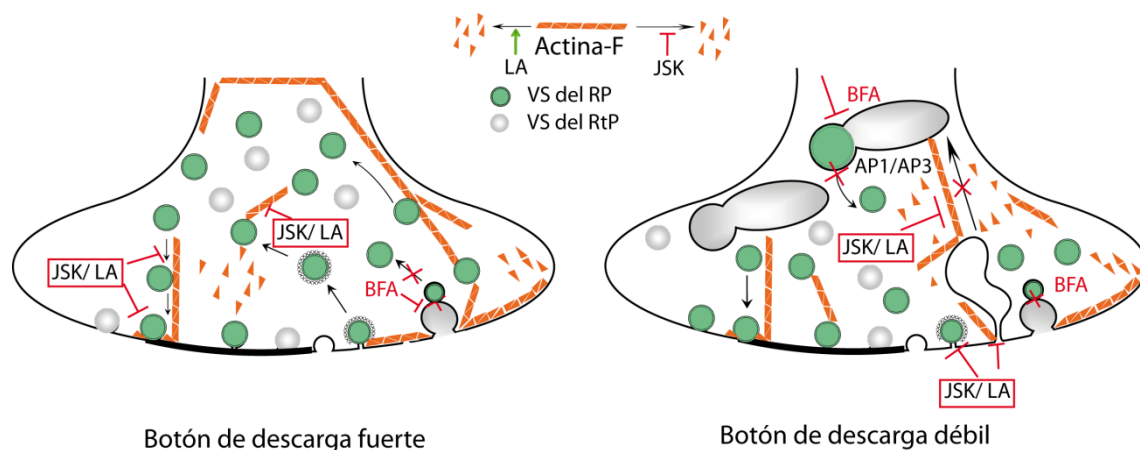


Figura 61: Resumen gráfico para la modelización de los botones de descarga fuerte (izquierda) y descarga débil (derecha) atendiendo a la dependencia del ciclo vesicular de la dinámica del

## Discusión

citoesqueleto de actina y del reciclamiento dependiente de AP-1 y AP-3. Nótese la abundancia relativa de VSs en cada uno de los botones sinápticos.

Mientras que en los botones de descarga débil, los mecanismos de endocitosis parecen depender en mayor medida de la dinámica del citoesqueleto de actina, en los de descarga fuerte la formación de filamentos es necesaria para la translocación y el correcto posicionamiento de las VSs próximas a la zona activa. Estos procesos son los más afectados por la alteración de la dinámica del citoesqueleto (Wang *et al.* 1996, Wolf *et al.* 2015), traducándose, así, en una dependencia de la respuesta exocitótica de estos botones con la dinámica del citoesqueleto de actina.

Un aspecto de gran importancia es tratar de extrapolar estos resultados a la situación fisiológica existente en las sinapsis "*en-passant*" entre la fibra paralela de las neuronas granulares y las dendritas de las neuronas de Purkinge (Ramón y Cajal 1911). Estas sinapsis constituyen la principal aferencia de naturaleza excitatoria de las neuronas de Purkinge, por lo que los mecanismos responsables de la modulación de la neurotransmisión en estas sinapsis son los consecuentes, en última instancia, del aprendizaje motor y la coordinación fina del movimiento en las que participa el cerebelo (Ito 2008).

En estas sinapsis, el proceso de aprendizaje motor o "refinamiento de la coordinación motora" es posible gracias a los mecanismos de plasticidad sináptica que se establecen en la sinapsis entre la fibra paralela y las dendritas de las neuronas de Purkinge (Ito 1989, Ito 2001, Ito 2002, Ito 2008). Estos mecanismos de potenciación o depresión sináptica basan su funcionamiento en la coordinación de la respuesta sináptica entre las células pre-y post-sinápticas, siendo la respuesta de la célula postsináptica la responsable de la modulación de la respuesta exocitótica. Muchos de estos mecanismos de plasticidad sináptica requieren la síntesis de un mensajero retrógrado que permite la coordinación entre la célula presináptica y la postsináptica. Entre los mensajeros retrógrados se encuentran el óxido nítrico (NO) y los endocannabinoides (véase sección 6.5.4 y 6.6).

Con respecto a la síntesis de NO, aunque no actúe como mensajero retrógrado en el presente modelo celular, se ha constatado que la activación de la vía de señalización NO/GMPc es determinante en la regulación del ciclo vesicular sináptico. Esta vía de señalización contribuye a aumentar la eficacia de reciclamiento (Micheva *et al.* 2003,

## Discusión

Micheva & Smith 2005), reduciendo la contribución de la EM y aumentando el porcentaje de botones de descarga fuerte (Collado-Alsina *et al.* 2014, Collado-Alsina *et al.* 2017). En esta vía de señalización, el efector presináptico es la quinasa dependiente de GMPc, cGKII, cuyo nivel de expresión aumenta con el desarrollo. La activación de cGKII se traduce en un incremento de la velocidad de endocitosis debido a la elevación de los niveles de PIP<sub>2</sub> necesarios para la EMC, potenciando así un reciclamiento vesicular más eficiente (Eguchi *et al.* 2012). En este sentido, el incremento de los niveles de dicha enzima con el desarrollo neuronal *in vivo*, unido a que el reciclamiento vesicular es más eficiente cuanto mayor es la contribución de la EMC apoya la idea de que los botones de descarga fuerte, caracterizados por un reciclamiento vesicular más eficiente, representan las sinapsis más maduras (Bartolome-Martin *et al.* 2012). Estudios posteriores revelaron que la aceleración de la endocitosis dependiente de cGKII requería de la activación de la quinasa efectora de Rho-A, ROCK, la cual promueve la polimerización de actina, facilitando tanto la endocitosis (Rust & Maritzen 2015, Wolf *et al.* 2015, Wu *et al.* 2016) como la liberación vesicular (Gonzalez-Forero *et al.* 2012). En esta línea, y dada la implicación de los filamentos de actina en el posicionamiento y translocación de las VSs hacia la zona activa (Wang *et al.* 1996, Wolf *et al.* 2015), parece evidente que la población de botones de descarga fuerte, y por tanto más maduros, dependan en mayor medida de la dinámica del citoesqueleto de actina para la exocitosis mantenida. Por otra parte, como se ha discutido previamente, la polimerización de actina, así como su capacidad de remodelación es decisiva en la promoción de las diferentes formas de endocitosis al generar la tensión mecánica necesaria para la internalización de orgánulos de endocitosis (fig 62a) (Rust & Maritzen 2015, Li *et al.* 2016, Wu *et al.* 2016). Por tanto, a la vez que se incrementan los niveles de PIP<sub>2</sub> necesarios para la EMC se puede facilitar la polimerización de actina necesaria para la misma.

## Discusión

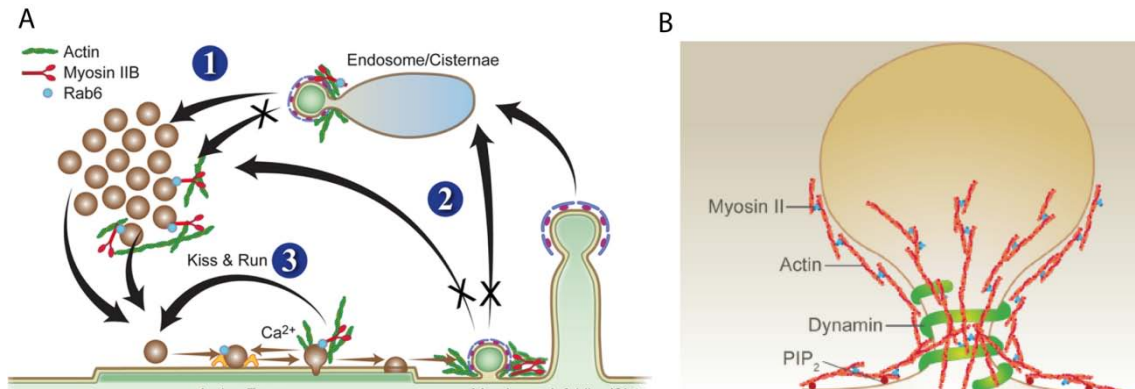


Figura 62: Participación del citoesqueleto de actina en los distintos mecanismos de endocitosis. A) Participación del citoesqueleto de actina y miosina II en la gemación de VSs a partir de endosomas formados durante EM (1), durante la EMC (2) y en el mecanismo "Kiss & Run" (3). Adaptado de Kavalali, 2006. B) Participación de los filamentos de actina y miosina II en la invaginación de las estructuras endosomales en EM. Adaptado de Nguyen 2015.

### 6.5. Las neuronas corticales Fmr1 KO presentan un reciclamiento vesicular más eficiente que sus homólogas de fenotipo salvaje

#### 6.5.1. La despolimerización de los filamentos de actina disminuye la intensidad de marcaje con FM1-43 en neuronas corticales Fmr1 KO y aumenta la velocidad de liberación de la sonda

Como se ha descrito en secciones anteriores, el citoesqueleto de actina juega un papel determinante en la modulación del ciclo vesicular. A la luz de esos hechos, se decidió estudiar su implicación en neuronas corticales de ratón cultivadas durante 14 DIV, analizando de forma comparativa la susceptibilidad a la interrupción de la dinámica de la actina en neuronas WT y Fmr1 KO. Este tipo de análisis resulta de gran interés, ya que en la literatura científica numerosos trabajos han reportado alteraciones en el equilibrio de actina en neuronas carentes del gen FMR1 (Chen *et al.* 2010, Dolan *et al.* 2013, Huber *et al.* 2015, Tabet *et al.* 2016) que, en buena lógica, parecen subyacer a los cuadros de autismo descritos (Nolze *et al.* 2013, Maurin *et al.* 2014, Michaelsen-Preusse *et al.* 2016, Huber *et al.* 2015, Michaelsen-Preusse *et al.* 2018).

## Discusión

El primer hecho llamativo de estos experimentos fue que, tras la segregación de las respuestas de liberación de sonda en las dos poblaciones de botones (botones de descarga fuerte y débil), no se observaron diferencias en los valores de fluorescencia inicial de FM1-43 de ambas poblaciones, en contraposición a lo observado en neuronas granulares de cerebelo (Bartolome-Martin *et al.* 2012, Collado-Alsina *et al.* 2014, Ramperez *et al.* 2017). Esta segregación, aunque sin cambios en los valores de fluorescencia inicial entre ambas poblaciones de botones, sí mostró diferentes perfiles de liberación, como también se constata en modelos de hipocampo y cerebelo (Broek *et al.* 2016), acreditando, de este modo, la existencia de las dos poblaciones de botones (botones de descarga fuerte y botones de descarga débil) en neuronas corticales de cerebro.

La incubación con LA 20 minutos previos a la carga de FM1-43 mostró una reducción significativa de los valores de fluorescencia inicial en las dos poblaciones de botones Fmr1 KO, no encontrándose diferencias en los valores de fluorescencia inicial entre ambas. Además, el tratamiento con LA se tradujo en cinéticas de liberación más rápidas, tanto en los botones de descarga fuerte como en los botones de descarga débil de ambos genotipos. La interpretación plausible de estos resultados sería la siguiente: la despolimerización del citoesqueleto de actina conduce a una internalización deficiente de sonda, de forma más acentuada en las neuronas Fmr1 KO dada la disfunción en la polimerización de actina ya existente en dicho genotipo (Chen *et al.* 2010, Huber *et al.* 2015, Tabet *et al.* 2016). El menor marcaje vesicular observado en células Fmr1 KO puede deberse a un menor reclutamiento vesicular durante la exocitosis (Kuromi & Kidokoro 1998, Sakaba & Neher 2003, Rust & Maritzen 2015), a defectos endocitóticos (Akbergenova & Bykhovskaia 2009, Nguyen *et al.* 2012, Watanabe *et al.* 2013b, Wu *et al.* 2016, Li *et al.* 2016) o la combinación de ambos factores como se ha discutido previamente. Esta situación favorecería que las vesículas recicladas permanezcan más próximas a la zona activa, máxime al bloquearse la polimerización de filamentos de actina que dificultaría la incorporación de VSs al pool de reserva (Bykhovskaia 2011, Rust & Maritzen 2015), traducándose, de este modo, en cinéticas de liberación más rápidas.

A su vez, el tratamiento con JSK no produjo diferencias en los valores de fluorescencia inicial de FM1-43 en ningún genotipo, mientras que aceleró la subsiguiente liberación vesicular tanto en botones de descarga fuerte como en los de descarga débil de neuronas WT. Por el contrario, en neuronas Fmr1 KO, este efecto sólo fue patente en los botones de descarga débil, presumiblemente reflejando una mayor inmadurez de

## Discusión

dichos botones y su mayor dependencia del citoesqueleto de actina (Zhang & Benson 2001). En este caso, los resultados sugieren un modelo en el cual la estabilización de los filamentos de actina no altera la magnitud de la respuesta exocitótica ni produce defectos endocitóticos en ninguno de los genotipos al no verse modificada la cantidad de sonda internalizada. Sin embargo, este tratamiento si se traduce en cinéticas de liberación más rápidas en WT y en los botones de descarga lenta de neuronas Fmr1 KO.

### **6.5.2. La desestabilización del citoesqueleto de actina en situación de reposo no afecta a la ultraestructura presináptica de neuronas corticales**

A tenor de los resultados obtenidos en los experimentos de FM1-43, se procedió a evaluar si el tratamiento con estos fármacos, en situación de reposo, se traducían en la modificación de la ultraestructura de terminales WT y Fmr1 KO. En este sentido no se observaron diferencias en la superficie de la sección del terminal sináptico o la longitud de la zona activa. Un hecho destacable es que la cuantificación del número de VSs por unidad de superficie sináptica (densidad de vesículas) reflejó un aumento generalizado de dicho parámetro en el genotipo Fmr1KO con respecto a las neuronas WT, sin verse afectado en ningún caso por el tratamiento farmacológico. A su vez, este parámetro se vio acompañado de un mayor número de VSs en contacto físico con la membrana plasmática o "docked" en neuronas Fmr1 KO, tal y como se ha descrito en hipocampo (Klemmer *et al.* 2011), sin que dicho valor se modificase por los tratamientos farmacológicos en ninguno de los genotipos. Finalmente se estudió la posición relativa de las VSs con respecto a la ZA analizando para ello la frecuencia relativa de VSs por compartimentos de 10 nm de distancia desde la zona activa. Este análisis no reveló diferencias en cualquiera de las condiciones experimentales ensayadas en ninguno de los dos genotipos, descartando así que el efecto observado en el número de vesículas "docked" se debiese a una mayor proximidad neta de las VSs a la zona activa.

A la luz de estos resultados se pueden inferir las siguientes conclusiones: por una parte la desestabilización del equilibrio entre actina-F y actina-G no produce alteraciones en la ultraestructura de los terminales sinápticos ni efectos específicos en ninguno de los parámetros analizados. Por otra parte, los terminales Fmr1 KO presentan una mayor densidad de VSs y un mayor número de VSs ancladas la zona activa sin que dicho efecto esté motivado por diferencias en la proximidad relativa de

## Discusión

las VSs a la zona activa. En este sentido, el mayor número de VSs amarradas parece guardar relación con la densidad de VSs.

### **6.5.3. Las neuronas Fmr1 KO presentan mayor densidad de VSs y mayor número de VSs ancladas a la zona activa**

Puesto que la microscopía electrónica en condiciones basales reveló un aumento de la densidad de VSs y un mayor número de VSs ancladas a la zona activa, se decidió estudiar el efecto que la estimulación ejercía en la ultraestructura de los terminales. Para ello, se analizaron 3 condiciones experimentales en ambos genotipos: células en condiciones de reposo (basal), estimuladas durante 90 s con KCl 50 mM y fijadas inmediatamente (estimulado y fijado a 0 min) y estimuladas durante 90 s con KCl 50 mM y fijadas 10 min más tarde (estimulado y fijado a 10 min).

Un aspecto llamativo observado fue que la estimulación y fijación inmediatamente después del cese del estímulo provocó una disminución significativa de la longitud de la zona activa en neuronas Fmr1 KO. El hecho de que este efecto no se manifestase en la condición basal descarta que se trate de un rasgo morfológico propio del fenotipo X-Frágil. Por otra parte, este efecto que se manifestaba como resultado de una estimulación intensa, se revertía cuando se dejaban transcurrir 10 minutos entre la estimulación y la fijación. Este resultado sugiere una desestructuración temporal y reversible de la zona activa como resultado de una estimulación intensa. En este sentido, y aunado al carácter dinámico de la zona activa (Ackermann *et al.* 2015), múltiples factores pueden contribuir a este fenómeno. Como se ha discutido anteriormente, el citoesqueleto de actina juega un papel estructural y funcional clave en el mantenimiento de los terminales sinápticos (Dillon & Goda 2005, Bleckert *et al.* 2012, Nelson *et al.* 2013, Rust & Maritzen 2015), con especial protagonismo en los estadios más inmaduros de las sinapsis (Zhang & Benson 2001). En este sentido, la pérdida de integridad de la zona activa podría ser, en parte, ocasionada por la disfunción en la polimerización de actina descrita en neuronas carentes de FMRP (Chen *et al.* 2010, Dolan *et al.* 2013, Nolze *et al.* 2013, Huber *et al.* 2015, Tabet *et al.* 2016), un efecto que se vería magnificado al aumentar la demanda de F-actina durante la estimulación (Shupliakov *et al.* 2002, Bellani *et al.* 2010). En línea con estos resultados, en neuronas granulares de cerebelo se ha constatado una disminución de la densidad integrada de fluorescencia de la proteína de citomatrix, Bassoon, como

## Discusión

resultado la incubación con los fármacos JSK y LA previo a una estimulación de idénticas características a la empleada en estos experimentos.

Por otra parte, se observó un incremento significativo de la densidad de VSs acompañado de un descenso del cociente endosoma/VS en neuronas Fmr1 KO en las 3 condiciones experimentales. Estos resultados sugieren un reciclamiento más eficaz en estas neuronas, y pueden explicarse de la siguiente forma: la estimulación química promueve una gran liberación de VSs, que, en neuronas Fmr1 KO, se reciclarían por mecanismos más rápidos y eficientes, como EMC, en contraposición a formas más lentas, como EM (Clayton *et al.* 2008, Clayton & Cousin 2009, Cheung & Cousin 2013). En este escenario, una mayor contribución relativa de la EM en neuronas WT daría lugar a un mayor número de endosomas en los terminales y concomitantemente un menor número de VSs (Bartolome-Martin *et al.* 2012, Ramperez *et al.* 2017), propiciando, de este modo, un reciclamiento vesicular más eficiente en neuronas Fmr1 KO.

Otra diferencia estructural relevante entre las neuronas Fmr1 KO y WT es el mayor número de VSs "docked" encontradas en las primeras. Se ha sugerido que dichas vesículas constituyen el correlato estructural del RRP (Rosenmund & Stevens 1996, Schikorski & Stevens 2001, Watanabe *et al.* 2013b), y que serían reutilizadas preferentemente en una segunda estimulación, favoreciendo un reciclamiento local próximo a la zona activa (Rey *et al.* 2015). La cuantificación de dichas VSs mostró un aumento de éstas en neuronas Fmr1 KO tanto en situación de reposo como en la condición de estimulación y fijación inmediatamente tras el cese del estímulo. Sin embargo, cuando la fijación tuvo lugar 10 minutos después de la estimulación, el número de VSs amarradas a la zona activa en células WT igualó al de las células Fmr1 KO. Estos resultados ponen de manifiesto que la fracción de VS "docked" en células Fmr1 KO se encuentra aumentada en condiciones basales. Por otra parte, una estimulación intensa incrementa ligeramente esta fracción en células Fmr1 KO, mientras que este efecto sólo es observado en células WT transcurridos 10 minutos desde el cese del estímulo. A la luz de estos resultados cabe plantearse un modelo en el cual la estimulación desencadena un proceso de facilitación o plasticidad sináptica a corto plazo, STP (por sus siglas en inglés, "*Short Term Plasticity*") capaz de aumentar el tamaño del RRP (Fioravante & Regehr 2011). Esta facilitación sináptica es más rápida en el genotipo Fmr1 KO, mientras que en WT, pese a requerir más tiempo, se manifiesta con mayor magnitud. En relación con este tipo de plasticidad sináptica se han descrito múltiples alteraciones en procesos de STP en ausencia de FMRP (Zhang

## Discusión

*et al.* 2009, Olmos-Serrano *et al.* 2010). El modelo propuesto está en consonancia con resultados obtenidos en sinapsis CA3-CA1 de hipocampo, donde se ha puesto de manifiesto que en neuronas Fmr1 KO una estimulación intensa promueve un aumento en la amplitud de las corrientes excitatorias postsinápticas atenuando un proceso de facilitación sináptica en el genotipo Fmr1 KO (Deng *et al.* 2011).

Estos resultados plantearon la cuestión de si el mayor número de VSs amarradas en la zona activa estaba ligado a una mayor proximidad neta de las VSs a la zona activa. Para ello, se analizó la distancia de las VSs a la zona activa por compartimentos de 10 nm de distancia en las 3 condiciones experimentales, con especial interés en las VSs situadas a menos de 10 nm de la zona activa, por localizarse aquí las VSs "docked" (Schikorski & Stevens 2001, Sudhof 2012a). Los histogramas de distancias a zona activa mostraron un fuerte incremento del porcentaje de VSs en los 10 primeros nm en neuronas Fmr1 KO estimuladas y fijadas inmediatamente después del cese del estímulo, mientras que el efecto no se observó en la condición basal ni transcurridos 10 minutos después de la estimulación. Estos resultados dan lugar a las siguientes conclusiones: el mayor número de VSs "docked" en neuronas Fmr1 KO no se correlaciona con un acercamiento neto de las VSs a la zona activa. Por otra parte, una estimulación intensa aumenta drásticamente la fracción de VSs situadas más próximas a la zona activa (< 10 nm) de forma selectiva en el genotipo Fmr1 KO, siendo revertida esta situación a los 10 minutos.

### **6.5.4. Estímulos breves promueven la liberación de una mayor proporción de vesículas recicladas en neuronas Fmr1 KO**

A la luz de los resultados de ME discutidos anteriormente que reflejaban un reciclamiento más eficaz en neuronas Fmr1 KO, nos preguntamos la razón por la cual dicho reciclamiento no era evidente en los experimentos de FM1-43. Quizá la respuesta estaba en la duración e intensidad de la estimulación utilizada para inducir la liberación de la sonda. Para abordar esta hipótesis, se marcaron los botones con FM1-43 y posteriormente se indujo la liberación de la sonda aplicando dos estimulaciones con KCl 50 mM de distinta duración: una estimulación breve de 10 s (S1) encaminada a liberar las VSs más próximas a la zona activa, y por tanto de rápida movilización (Collado-Alsina *et al.* 2014), y posteriormente una estimulación mantenida durante 2,5 min (S2) con el objeto de movilizar la totalidad del RP, ambos estímulos

## Discusión

espaciados 50 s. La comparativa de las cinéticas mostró un claro aumento de la fracción de FM1-43 liberada tras S1 y transcurridos 50 s en los botones Fmr1 KO, siendo el descenso de fluorescencia observado tras S1 un marcador de la liberación asincrónica acontecida. Estos resultados son compatibles con un aumento del tamaño del RRP en neuronas corticales Fmr1 KO, tal como se ha discutido anteriormente y que también ha sido descrito en neuronas carentes de FMRP en hipocampo (Deng *et al.* 2011).

Por otra parte, la intensidad de fluorescencia inicial está íntimamente asociada con el número de vesículas liberadas durante el estímulo conducente a la carga (Kuromi & Kidokoro 1999), por lo que los valores comparables de dicho parámetro son indicativos de un tamaño similar del RP (Henkel & Betz 1995, Harata *et al.* 2001, Richards *et al.* 2005, Fowler & Staras 2015). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia media por experimento entre los genotipos WT y Fmr1 KO, sugiriendo un tamaño comparable del RP en ambos genotipos. En esta línea, se ha descrito que el tamaño del RP se correlaciona de forma inversa con la velocidad de las cinéticas de liberación (Welzel *et al.* 2011), no habiéndose encontrado diferencias en las cinéticas de liberación tras el estímulo S2, una evidencia que reafirma el tamaño homogéneo del RP en ambos genotipos. En este sentido, el mayor porcentaje final de descarga alcanzando tras el estímulo S2 en neuronas Fmr1 KO ha de interpretarse en términos de un reciclamiento vesicular más eficiente, un hecho que ha sido constatado por otros autores (Deng *et al.* 2011).

Los resultados derivados de los estudios de microscopía electrónica llevados a cabo mostraron un aumento del número de VSs "docked" en el genotipo Fmr1 KO, siendo dichas vesículas el correlato estructural de las vesículas integrantes del RRP (Schikorski & Stevens 2001, Watanabe *et al.* 2013b). Estos resultados plantearon la hipótesis de que el RRP pudiera estar aumentado en las neuronas corticales Fmr1 KO. Los resultados obtenidos mediante una estimulación de 10 s con KCl en neuronas marcadas con FM1-43 proporcionaron una primera evidencia sobre el mayor tamaño del RRP en neuronas corticales Fmr1 KO. Sin embargo, dicha estimulación se ha visto que es capaz de movilizar vesículas del RP (Ramirez-Franco *et al.* 2014), no resultando de este modo una herramienta de gran precisión para la cuantificación del tamaño del RRP. Por otra parte, la práctica nulidad de botones silentes en ambos genotipos hizo pensar que se trataba de una estimulación que excedía la capacidad de depleción del RRP (Castillo *et al.* 2012), máxime si se tiene en cuenta la naturaleza

## Discusión

reversible de este fenómeno dependiente de actividad (Ramirez-Franco *et al.* 2014). De este modo, para conseguir una mejor estimación del tamaño de esta fracción vesicular en neuronas corticales, se empleó una estimulación eléctrica de 40 PA a 20 Hz, un estímulo clásicamente utilizado para la movilización selectiva del RRP (Denker & Rizzoli 2010, Welzel *et al.* 2011, Schikorski 2014, Rey *et al.* 2015, Kaeser & Regehr 2017). Tras un minuto de reposo, las neuronas fueron estimuladas con 900 PA a 20 Hz, lo que permitió la visualización de la totalidad de botones sinápticos funcionales.

Cuando se analizaron las respuestas cinéticas se observó en determinados botones una ausencia total de respuesta al primero de los estímulos (40 PA a 20 Hz), un efecto que se manifestó en mayor proporción en el genotipo WT. La falta de respuesta al primero de los estímulos puede interpretarse como la ausencia de un RRP definido, esto es, la ausencia de VSs colocadas y funcionalmente dispuestas para su liberación (Rosenmund & Stevens 1996, Rizzoli & Betz 2004). Este comportamiento podría estar regulado por la señalización del sistema endocanabinoide (Ramirez-Franco *et al.* 2014). En el síndrome del X-Frágil, así como en numerosos trastornos cognitivos y síndromes de autismo, se ha descrito un desacoplamiento de la señalización por endocannabinoides (Foldy *et al.* 2013) y la LTD mediada por el receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5) (Jung *et al.* 2012, Straiker *et al.* 2013). Este efecto parece estar mediado, al menos parcialmente, por la interacción neurexina-neuroliquina, determinante en el proceso de inducción de silenciamiento ejercido por los endocannabinoides (Krueger *et al.* 2012, Anderson *et al.* 2015). En relación con esto, un rasgo característico de los trastornos que cursan con autismo es una desregulación de la transcripción de los genes que codifican para las diferentes isoformas de neuroliquina además de propiciarse la proteólisis de los complejos neurexina-neuroliquina (Chmielewska *et al.* 2018). El resultado es una inhibición de la señalización mediada por el sistema endocanabinoide (Anderson *et al.* 2015, Wang 2016). El silenciamiento sináptico cursa con una inhibición de la entrada de calcio en los terminales sinápticos (Castillo *et al.* 2012) y provoca una retracción de las VSs próximas a la zona activa (Ramirez-Franco *et al.* 2014) que es dependiente de la actividad contráctil de los filamentos de acto-miosina (McFadden *et al.* 2018), por lo que un déficit en la señalización del sistema endocanabinoide podría justificar el mayor tamaño del RRP de una subpoblación de botones en neuronas FMR1 KO.

Sumado a este hecho, se observó que las neuronas Fmr1 KO mostraban un mayor porcentaje de liberación de FM1-43 tras el estímulo de 40 PA a 20 Hz y la cinética era más rápida que en neuronas WT. En este aspecto, y pese a que el componente celular

## Discusión

mayoritario de los cultivos son las neuronas piramidales excitatorias, no se debe obviar la presencia de neuronas GABAérgicas. Una contribución diferente del componente inhibitorio sobre la neurotransmisión podría también explicar los resultados obtenidos. A este respecto, y sumado al hecho de la desregulación de la señalización excitatoria mediada por el sistema endocanabinoide anteriormente mencionado, se ha descrito que la ausencia de neuroliquina-3 o mutaciones puntuales de dicha proteína provocan alteraciones en la señalización tónica mediada por el sistema endocanabinoide de diferentes poblaciones de interneuronas de hipocampo (Foldy *et al.* 2013), siendo estas alteraciones rasgos característicos de los trastornos cognitivos y síndromes de autismo (Sudhof 2008, Krueger *et al.* 2012, Anderson *et al.* 2015, Wang 2016). Estas alteraciones se traducen en una menor probabilidad de liberación de las neuronas GABAérgicas, lo que conlleva una desinhibición del tono excitatorio que podría dar cuenta del mayor tamaño de RRP en neuronas Fmr1 KO. Desde un punto de vista clínico, numerosos trabajos coinciden en señalar el uso de agonistas canabinoides con aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de los síndromes de autismo y/o trastornos cognitivos (Castillo *et al.* 2012, Wyrofsky *et al.* 2015, Gomis-Gonzalez *et al.* 2016).

Por otra parte, la mayor velocidad de deplección de las VSs del RRP sugiere un acoplamiento más eficiente entre la entrada de calcio y la maquinaria exocitótica de las VSs pre-ensambladas (Sudhof 2012a, Sudhof 2013). Esta mayor eficiencia puede ser debida a una mayor entrada de calcio en los terminales. En relación con esta hipótesis, en neuronas de ganglio de la raíz dorsal se ha demostrado una mayor entrada de calcio en los terminales sinápticos en ausencia de FMRP, un efecto presináptico promovido por un aumento de la densidad de canales de calcio tipo N ( $Ca_v2.2$ ) al inhibirse la degradación mediada por el proteasoma (Ferron *et al.* 2014). Sin embargo, este no es el único efecto presináptico mediado por FMRP que pudiera justificar este comportamiento. Tanto en sinapsis CA3-CA1 de hipocampo como en neuronas corticales se ha constatado una mayor duración de los potenciales de acción. Este efecto es independiente del papel que juega FMRP como regulador transcripcional, estando producido por la ausencia de interacción de FMRP con las subunidades  $\beta$ -reguladoras de los canales de potasio BK (Deng *et al.* 2011), propiciando un alargamiento temporal de la espiga y concomitantemente una mayor entrada de calcio en los terminales, dando lugar a una mayor liberación vesicular y más rápida.

## Discusión

Finalmente, la aplicación de un estímulo de mayor intensidad (900 PA a 20 Hz) no produjo cambios en la fracción de FM1-43 ni en la cinética de liberación. Este resultado contrasta con el obtenido mediante una estimulación con KCl 50 mM, donde si se observó una mayor magnitud de la respuesta excitotóxica en neuronas Fmr1KO, señalando que al igual que en las células granulares de cerebelo de rata, la estimulación química con KCl 50 mM libera una mayor proporción de VSs previamente marcadas (Ramperez *et al.* 2017)

### 6.5.5. Análisis de ultraestructura de neuronas piramidales de corteza somatosensorial en situación de reposo

Los estudios previos de microscopía electrónica de células cultivadas reflejaron determinadas alteraciones ultraestructurales entre las neuronas corticales WT y Fmr1 KO en lo que a densidad y número de VSs "docked" se refiere. Este modelo presenta el inconveniente de tratarse de células disociadas que posteriormente establecen contactos sinápticos con células vecinas, alterándose de este modo las conexiones sinápticas que se establecen *in-vivo*. Para disponer de un modelo celular más próximo a la situación fisiológica, se realizaron estudios de microscopía electrónica en secciones de corteza de cerebro de ratón adulto. En dicho tejido, se estudió la ultraestructura de las neuronas piramidales de la capa de II/III de la corteza somatosensorial por albergar esta región una gran abundancia de sinapsis excitatorias establecidas entre células piramidales de la capa V y neuronas piramidales de la capa II/III (Lorente de Nó 1949, Valverde 2002). Esta región del cerebro es la responsable de la percepción y el procesamiento de la respuesta sensorial, habiéndose descrito en el síndrome del X-Frágil múltiples alteraciones en la percepción sensorial (Hagerman *et al.* 2009, Dolan *et al.* 2013, Gross *et al.* 2015).

Una de las principales ventajas que presenta el estudio en rodajas de cerebro es que preserva la citoarquitectura del cerebro, permaneciendo inalteradas las conexiones sinápticas. Por este motivo, y dado que una de las características fenotípicas más destacables del síndrome del X-Frágil es el aumento aberrante de espinas dendríticas hipofuncionales (Comery *et al.* 1997, Irwin *et al.* 2000, Bagni & Greenough 2005), se procedió a cuantificar la densidad de sinapsis asimétricas por campo. En consonancia con la bibliografía existente, se observó un claro aumento de la densidad de dichas sinapsis en el genotipo Fmr1 KO con respecto al WT, corroborando la afectación de

## Discusión

dicha región del cerebro al igual que se ha descrito en la corteza visual y temporal (Irwin *et al.* 2001, Irwin *et al.* 2002). Derivado de este hecho, las espinas dendríticas existentes presentan una morfología alterada en forma de "dedo" en contraposición a las espinas más maduras o tipo "champiñón" (Bagni & Greenough 2005, Dolan *et al.* 2013), mostrando una menor superficie en las secciones observadas al microscopio electrónico. Para contrastar esta hipótesis, se midió la superficie de las secciones de las espinas en las sinapsis estudiadas, confirmándose una disminución de dicho parámetro en las sinapsis Fmr1 KO.

A nivel presináptico se cuantificó la densidad de VSs, encontrándose un aumento de este parámetro en el genotipo Fmr1 KO, sin que dicho resultado fuese debido a una diferente proporción endosoma/Vs. Los datos encontrados en la bibliografía no muestran una tendencia homogénea en distintas regiones cerebrales, ya que en sinapsis CA3-CA1 de hipocampo se ha descrito una disminución de dicho parámetro en neuronas carentes de FMRP (Klemmer *et al.* 2011), mientras que en neuronas de Purkinje no se han observado cambios significativos entre el genotipo WT y Fmr1 KO (Broek *et al.* 2016). Sin embargo, el resultado obtenido es consistente con la tendencia observada en neuronas corticales cultivadas, corroborando los resultados obtenidos en dicho modelo. Tal y como se observó en neuronas corticales cultivadas, el mayor número de VSs por unidad de superficie se acompañó de un aumento del número de VSs "docked" por sinapsis en el genotipo Fmr1 KO reafirmando el mayor tamaño del RRP en neuronas Fmr1 KO (Deng *et al.* 2011). Finalmente, para estudiar la distribución de las VSs en relación con su distancia a la zona activa, se analizó la distancia de éstas a la zona activa por compartimentos de 10 nm. Los resultados no mostraron diferencias entre ambos genotipos, descartando así que el mayor tamaño del RRP fuese debido a una mayor proximidad generalizada del pool total de VSs a la zona activa.

### **6.5.6. La estimulación eléctrica evidencia un reciclamiento vesicular más eficiente de las neuronas Fmr1 KO en micrografías de corteza cerebral**

Una vez analizada la ultraestructura de los terminales de neuronas piramidales en condiciones de reposo, se estudió el efecto que produce una estimulación prolongada sobre los terminales de dichas neuronas. Este tipo de aproximación resulta de gran utilidad, ya que permite obtener un correlato estructural del reciclamiento vesicular

## Discusión

estudiado previamente en neuronas aisladas mediante FM1-43. Para ello, se estimularon las neuronas piramidales de la capa V de la corteza somatosensorial con 900 PA a una frecuencia de 20 Hz, analizándose las sinapsis que forman las proyecciones de estas neuronas con las células de la capa II/III (Lorente de Nó 1949, Valverde 2002). Como se ha discutido anteriormente, un tren de 900 PA a una frecuencia de 20 Hz es un protocolo de estimulación que ha sido extensamente utilizado para la movilización del RP en otras neuronas (Ryan & Smith 1995, Ratnayaka *et al.* 2012, Rey *et al.* 2015), razón por la cuál se ha seleccionado para el estudio del reciclamiento vesicular en neuronas piramidales.

Al igual que en la situación de reposo, se observó un aumento de la densidad de VSs en los terminales Fmr1 KO que fue acompañado de un mayor número de VSs "docked".

La estimulación eléctrica propició un incremento de las estructuras endosomales en los terminales WT en contraposición a los terminales Fmr1 KO, arrojando como resultado un cociente endosoma/VS superior en los terminales WT. En paralelo a este hecho, las neuronas Fmr1 KO exhibieron un mayor porcentaje de VSs situadas en los 10 nm más próximos a la zona activa. La interpretación de estos resultados sugiere, como ya se ha planteado previamente en los experimentos de FM1-43, un reciclamiento vesicular más eficiente en los terminales Fmr1 KO, que cursa con una menor formación de endosomas y un mayor número de VSs próximas a la zona activa para su inmediata disposición. La menor formación de endosomas es indicativo de una menor contribución relativa de la endocitosis masiva a favor de otras formas de endocitosis más eficientes en la regeneración de VSs, como la EMC.

### **6.6. Causas de la mayor eficiencia en el reciclamiento vesicular de neuronas Fmr1 KO e implicaciones fisiológicas**

Los resultados obtenidos perfilan un modelo en el cuál el reciclamiento vesicular es más eficiente en neuronas Fmr1 KO. Esta conclusión se fundamenta en varios hechos. Por una parte, una estimulación conducente a la deplección del RP genera menos estructuras endosomales en los terminales Fmr1 KO, con el consiguiente aumento proporcional del número de VSs. Estos hallazgos pueden estar motivados, al menos en parte, por la deficiente polimerización del citoesqueleto de actina en neuronas Fmr1

## Discusión

KO (Chen *et al.* 2010, Dolan *et al.* 2013, Huber *et al.* 2015, Tabet *et al.* 2016). En este sentido, se ha constado que una deficiente polimerización de los filamentos de actina compromete la EM (Nguyen *et al.* 2012, Gormal *et al.* 2015), pudiendo favorecer mecanismos de internalización de VSs que dependan en menor medida del citoesqueleto de actina. Por otra parte, aunque dicha estimulación no produjo diferencias en el grado total de descarga, tal y como sugieren los experimentos de FM1-43, si incrementó la proporción de VSs más próximas a la zona activa, sugiriendo un reciclamiento vesicular más próximo a la zona activa, y en consecuencia, una mayor disponibilidad de VSs (Deng *et al.* 2011). En este sentido, la disfunción en la polimerización de los filamentos de actina durante la estimulación puede inhibir parcialmente la retrotranslocación de vesículas al interior del terminal sináptico, favoreciendo su mayor proximidad a la zona activa y dificultando su entrada en el RtP. En relación con ello, se observó que estímulos más breves, como es 40 PA a 20 Hz empleado en la movilización del RRP, liberaron una mayor proporción de sonda FM1-43 en neuronas Fmr1 KO, un hecho patente en la microscopía electrónica atendiendo al número de VSs "docked" y que confirma el mayor tamaño del RRP en el genotipo Fmr1 KO (Deng *et al.* 2011) .

Sin embargo, una pregunta suscitada por estos resultados es ¿a qué se debe el reciclamiento vesicular más eficiente y el mayor tamaño del RRP en neuronas carentes de FMRP? Aunque la respuesta no se conoce en su totalidad, ya se han esclarecido múltiples factores que subyacen a dicho fenómeno.

En primer lugar, conviene hacer una distinción entre los mecanismos moleculares dependientes de la interacción FMRP-proteína de aquellos dependientes del control transcripcional ejercido por FMRP. Entre los mecanismos dependientes de la interacción FMRP-proteína se ha descrito un aumento de la densidad de canales de calcio  $Ca_v2.2$  en ganglios de la raíz dorsal de neuronas Fmr1 KO. Este efecto está mediado por la falta de interacción entre la proteína FMRP y los canales de calcio, siendo dicha interacción necesaria para su degradación vía proteasoma (Ferron *et al.* 2014). A su vez, esta mayor entrada de calcio en los terminales parece estar promovida, al menos en parte, por una mayor duración de los potenciales de acción en hipocampo y corteza cerebral (Deng *et al.* 2013). FMRP regula la duración de los potenciales de acción modulando la sensibilidad a calcio de los canales de potasio BK, un control que se establece gracias a la interacción de las subunidades accesorias reguladoras  $\beta 4$  con FMRP, de modo que la ausencia de FMRP conduce a una mayor entrada de calcio en los terminales (Deng *et al.* 2013).

## Discusión

Estos hechos darían cuenta de una mayor liberación vesicular en neuronas Fmr1 KO, especialmente cuando se aplican estímulos breves donde la acumulación de calcio transitoria en el terminal sináptico es decisivo en la modulación de la magnitud de la respuesta excitotóxica (Sudhof & Rizo 2011, Sudhof 2012a). Sin embargo, estas evidencias *per-sé* no justifican el mayor tamaño del RRP en neuronas Fmr1 KO, ya que sus VSs están ancladas a la zona activa y el número de éstas se ha constatado que es mayor en neuronas Fmr1 KO aún en situación de reposo. Un hecho esclarecedor de este fenómeno radica en el correcto acoplamiento entre el terminal presináptico y la espina dendrítica postsináptica. En el establecimiento de sinapsis funcionales, la pareja de proteínas neurexina-neuroliquina juegan un papel decisivo en la coordinación de la neurotransmisión (Varoqueaux *et al.* 2006, Sudhof 2008). En relación con ello, la mayoría de síndromes de autismo que cursan con trastornos cognitivos, como el síndrome del X-Frágil en el presente caso, presentan alteraciones en el patrón de conexiones neurexina-neuroliquina (Sudhof 2008, Krueger *et al.* 2012, Anderson *et al.* 2015, Wang 2016). En esta línea se ha descrito que FMRP modula la traducción local de neuroliquina-1,2 y 3, resultando la excesiva traducción de estas proteínas en una degradación mediada por metaloproteinasas (Chmielewska *et al.* 2018). Este proceso evoca una deficiencia en la señalización mediada por estos complejos, habiéndose descrito que una deficiencia en la señalización neurexina-neuroliquina-3 produce una inhibición en la señalización tónica ejercida por el sistema endocanabinoide (Jung *et al.* 2012, Krueger *et al.* 2012, Anderson *et al.* 2015). Este efecto se traduce en una inhibición del silenciamiento mediado por el receptor de endocannabinoides CB1 (Castillo *et al.* 2012), lo que conduce de forma redundante a una mayor entrada de calcio en los terminales y la anulación del efecto retractor que el silenciamiento ejerce sobre la distribución de las VSs próximas a la zona activa (Ramirez-Franco *et al.* 2014). En relación con estos hechos, un trabajo reciente clarifica que la redistribución y concentración de las VSs alejadas de la zona activa producida por la activación del receptor de CB1 en hipocampo y corteza cerebral está mediada por la actividad contráctil de los filamentos de acto-miosina (McFadden *et al.* 2018), por lo que la disfunción de la polimerización de actina manifestada en el SXF (Chen *et al.* 2010, Dolan *et al.* 2013, Huber *et al.* 2015, Tabet *et al.* 2016) justifica los resultados encontrados.

A la luz de estos hechos, una interpretación plausible del mayor número de VSs amarradas a la zona activa observado en neuronas Fmr1 KO de corteza, e hipocampo

## Discusión

(Deng *et al.* 2011) es que estaría originada por una desinhibición del sistema endocanabinoide (Straiker *et al.* 2013, Anderson *et al.* 2015, Wang 2016).

Desde un punto de vista fisiológico, esta alteración de la neurotransmisión en corteza cerebral es responsable de muchas de las manifestaciones clínicas de dicho síndrome, tales como episodios isquémicos, trastornos cognitivos o la aparición de comportamientos estereotipados (Hagerman *et al.* 2009, Dolan *et al.* 2013, Huber *et al.* 2015). De hecho, siguiendo un abordaje clínico, múltiples estudios actuales señalan que la restitución de la función del sistema endocanabinoide mediante agonistas sintéticos constituyen una estrategia terapéutica en el tratamiento de los trastornos cognitivos y síndromes de autismo (Castillo *et al.* 2012, Wyrofsky *et al.* 2015, Gomis-Gonzalez *et al.* 2016).

Atendiendo a la fisiopatología del SXF el rasgo morfológico más destacado es el aumento de espinas dendríticas hipofuncionales, presentando estas espinas una morfología estrecha y elongada (tipo "dedo") en contraposición a las espinas dendríticas más anchas y de cabeza redondeada (tipo "champiñón") (Bagni & Greenough 2005, Dolan *et al.* 2013). Este fenotipo manifestado en el SXF se ha asociado a estadios neuronales inmaduros (Irwin *et al.* 2000, Nimchinsky *et al.* 2001, Galvez & Greenough 2005, Klemmer *et al.* 2011). A nivel molecular, las causas de dicho fenotipo parecen ser múltiples. Por una parte, como se ha discutido previamente, el establecimiento de contactos neurexina-neuroliquina aberrantes previene la formación de sinapsis funcionales (Sudhof 2008, Krueger *et al.* 2012). Sin embargo, el factor decisivo en la configuración y mantenimiento de la morfología de la espina dendrítica radica en el citoesqueleto de actina (Michaelsen-Preusse *et al.* 2018). Del mismo modo que se ha discutido la implicación del citoesqueleto de actina en la modulación del ciclo vesicular, esta red filamentosa juega un papel estructural decisivo en el mantenimiento de la forma y la topología de los diferentes elementos postsinápticos (Dillon & Goda 2005). En relación con ello, en hipocampo y corteza cerebral se ha descrito una activación deficiente de la vía de señalización Rac1>PAK (Chen *et al.* 2010, Dolan *et al.* 2013, Pyronneau *et al.* 2017), encargada de la remodelación y estabilización de los filamentos de actina, siendo dicha activación necesaria en la promoción de la polimerización de actina dependiente de actividad. Llegados a este punto, parece lógico pensar que ambos fenómenos estén molecularmente conectados. A este respecto, un trabajo reciente del grupo del Dr. Brose ha esclarecido la conexión entre la dinámica del citoesqueleto de actina y la señalización por la unión heterotípica neurexina-neuroliquina en un modelo mutante de

## Discusión

neurexina de *Drosophila*, DNRX, (Rui *et al.* 2017). En dicho estudio, se ha constatado la activación de Rac1 dependiente de la señalización por DNRX. Esta activación se produce gracias a la interacción que se establece entre el dominio PDZ de DNRX y la proteína presináptica Scribble, la cual interacciona con el factor intercambiador de nucleótidos de guanina de Rac1, DPix y lo activa (Rui *et al.* 2017). Se requiere esta secuencia de interacciones para la activación de Rac1 y la promoción de la polimerización de actina presináptica necesaria para el tráfico, localización y liberación vesicular (Sankaranarayanan *et al.* 2003, Wolf *et al.* 2015, Rust & Maritzen 2015), un proceso manifiestamente alterado en el SXF tal y como se ha constatado empíricamente y en la bibliografía existente (Chen *et al.* 2010, Dolan *et al.* 2013, Huber *et al.* 2015, Tabet *et al.* 2016). Además, como se ha discutido anteriormente, este desacoplamiento en la señalización neurexina-neuroliquina, conlleva una disfunción de la polimerización de actina, lo que redundará en la desinhibición de la señalización mediada por el sistema endocanabinoide (McFadden *et al.* 2018). En consonancia con estos datos, se ha demostrado que la inhibición farmacológica de PAK (del inglés, *p21-activated kinase*) reduce la densidad de espinas dendríticas hipofuncionales en corteza cerebral, disminuyendo y mejorando las principales manifestaciones clínicas comportamentales del SXF (Dolan *et al.* 2013).

## VII-Conclusiones

---

*"La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad"*

Jules Verne



# Conclusiones

## VII-CONCLUSIONES

### 7.1. Neuronas granulares de cerebelo de rata

7.1.1. La estimulación química (KCl 50 mM) produce una mayor liberación de vesículas marcadas con FM1-43 que la estimulación de campo (900 PA a 20 Hz ó 900 PA a 40 Hz) y con ella se detecta un mayor número de botones funcionales, haciendo de dicha estimulación un protocolo adecuado para la movilización del pool de reciclamiento.

7.1.2. La población de botones de descarga débil presenta mayor sensibilidad a la inhibición del reciclamiento vesicular dependiente de AP-1/AP-3. Este hecho conlleva una disminución del número de botones que responden a una segunda estimulación, persistiendo aquellos botones cuyas formas de reciclamiento son más rápidas e independientes de los complejos AP-1/AP-3.

7.1.3. La disrupción de la dinámica del citoesqueleto de actina disminuye la densidad de botones funcionales. Esta desestructuración del citoesqueleto de actina compromete la exocitosis, de forma más notoria en los botones de descarga fuerte, e inhibe la endocitosis en los botones de descarga débil, presumiblemente debido a la mayor contribución del citoesqueleto de actina en la EM.

7.1.4. La mayor dependencia del reciclamiento vesicular mediado por AP-1/AP-3 y de la dinámica del citoesqueleto de actina en los botones de descarga débil es indicativo de un menor grado de madurez que los botones de descarga fuerte.

### 7.2. Neuronas corticales de cerebro de ratón

7.2.1. La estabilización o la despolimerización de los filamentos de actina en condiciones de reposo no afecta a la ultraestructura de neuronas WT o Fmr1 KO. Sin embargo, la despolimerización del citoesqueleto de actina previo a un estímulo conducente a la carga de FM1-43 disminuye el número de VSs recicladas y acelera la velocidad de exocitosis.

7.2.2. Los estímulos breves promueven la liberación de una mayor proporción de VSs recicladas en neuronas Fmr1 KO y sugieren un mayor tamaño del RRP sin modificación del tamaño del RP.

## Conclusiones

7.2.3. La capa II/III de corteza cerebral de ratón Fmr1 KO presenta mayor densidad de contactos sinápticos de tipo asimétrico en relación al genotipo WT, asociado a una disminución del área de la sección postsináptica.

7.2.4. Los terminales sinápticos de neuronas piramidales Fmr1 KO muestran un mayor número de VSs "docked", confirmando el mayor tamaño del RRP en dicho genotipo y una mayor densidad de VSs.

7.2.5. La estimulación eléctrica corrobora un reciclamiento vesicular más eficiente en las sinapsis de las capas II/III de corteza cerebral de ratón Fmr1 KO que en el WT. Este reciclamiento en WT cursa con una menor acumulación de endosomas y una mayor proporción de VSs próximas a la zona activa.

## VIII-Bibliografía

---

"Que otros se jacten de las páginas que han escrito; a mí me enorgullecen las que he leído"

Jorge Luis Borges



# Bibliografía

## VIII-BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, F., Waites, C. L. and Garner, C. C. (2015) Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates. *EMBO Rep*, **16**, 923-938.
- Akbergenova, Y. and Bykhovskaia, M. (2009) Enhancement of the endosomal endocytic pathway increases quantal size. *Mol Cell Neurosci*, **40**, 199-206.
- Akbergenova, Y. and Bykhovskaia, M. (2010) Synapsin regulates vesicle organization and activity-dependent recycling at *Drosophila* motor boutons. *Neuroscience*, **170**, 441-452.
- Alabi, A. A. and Tsien, R. W. (2013) Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission. *Annu Rev Physiol*, **75**, 393-422.
- Altman, J. and Bayer, S. A. (1977) Time of origin and distribution of a new cell type in the rat cerebellar cortex. *Exp Brain Res*, **29**, 265-274.
- Alvarez de Toledo, G., Fernandez-Chacon, R. and Fernandez, J. M. (1993) Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature*, **363**, 554-558.
- Allison, D. W., Chervin, A. S., Gelfand, V. I. and Craig, A. M. (2000) Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: Maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules. *Journal of Neuroscience*, **20**, 4545-4554.
- Anderson, B. and Rutledge, V. (1996) Age and hemisphere effects on dendritic structure. *Brain*, **119 ( Pt 6)**, 1983-1990.
- Anderson, G. R., Aoto, J., Tabuchi, K. et al. (2015) beta-Neurexins Control Neural Circuits by Regulating Synaptic Endocannabinoid Signaling. *Cell*, **162**, 593-606.
- Annangudi, S. P., Luszpak, A. E., Kim, S. H. et al. (2010) Neuropeptide Release is Impaired in a Mouse Model of Fragile X Mental Retardation Syndrome. *ACS Chem Neurosci*, **1**, 306-314.
- Antonova, I., Arancio, O., Trillat, A. C., Wang, H. G., Zablow, L., Udo, H., Kandel, E. R. and Hawkins, R. D. (2001) Rapid increase in clusters of presynaptic proteins at onset of long-lasting potentiation. *Science*, **294**, 1547-1550.
- Ariel, P. and Ryan, T. A. (2010) Optical mapping of release properties in synapses. *Front Neural Circuits*, **4**.
- Auerbach, B. D., Osterweil, E. K. and Bear, M. F. (2011) Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature*, **480**, 63-68.
- Ba, W., van der Raadt, J. and Nadif Kasri, N. (2013) Rho GTPase signaling at the synapse: implications for intellectual disability. *Exp Cell Res*, **319**, 2368-2374.
- Bacaj, T., Wu, D., Yang, X., Morishita, W., Zhou, P., Xu, W., Malenka, R. C. and Sudhof, T. C. (2013) Synaptotagmin-1 and synaptotagmin-7 trigger synchronous and asynchronous phases of neurotransmitter release. *Neuron*, **80**, 947-959.
- Bagni, C. and Greenough, W. T. (2005) From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 376-387.
- Balakrishnan, S., Jackson, C., Russell, N. and Bellamy, T. C. (2011) Ectopic release sites lack fast vesicle recycling mechanisms, causing long-term depression of neuron-glia transmission in rat cerebellum. *Glia*, **59**, 82-93.
- Bamji, S. X., Shimazu, K., Kimes, N., Huelsken, J., Birchmeier, W., Lu, B. and Reichardt, L. F. (2003) Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly. *Neuron*, **40**, 719-731.
- Bartolome-Martin, D., Ramirez-Franco, J., Castro, E., Sanchez-Prieto, J. and Torres, M. (2012) Efficient synaptic vesicle recycling after intense exocytosis concomitant with the accumulation of non-releasable endosomes at early developmental stages. *J Cell Sci*, **125**, 422-434.

## Bibliografía

- Bear, M. F., Huber, K. M. and Warren, S. T. (2004) The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci*, **27**, 370-377.
- Becherer, U. and Rettig, J. (2006) Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res*, **326**, 393-407.
- Bellani, S., Sousa, V. L., Ronzitti, G., Valtorta, F., Meldolesi, J. and Chieregatti, E. (2010) The regulation of synaptic function by alpha-synuclein. *Commun Integr Biol*, **3**, 106-109.
- Bellocchio, E. E., Reimer, R. J., Fremeau, R. T., Jr. and Edwards, R. H. (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*, **289**, 957-960.
- Benfenati, F., Bahler, M., Jahn, R. and Greengard, P. (1989a) Interactions of synapsin I with small synaptic vesicles: distinct sites in synapsin I bind to vesicle phospholipids and vesicle proteins. *J Cell Biol*, **108**, 1863-1872.
- Benfenati, F., Valtorta, F., Bahler, M. and Greengard, P. (1989b) Synapsin I, a neuron-specific phosphoprotein interacting with small synaptic vesicles and F-actin. *Cell Biol Int Rep*, **13**, 1007-1021.
- Bergsman, J. B., Krueger, S. R. and Fitzsimonds, R. M. (2006) Automated criteria-based selection and analysis of fluorescent synaptic puncta. *J Neurosci Methods*, **152**, 32-39.
- Betz, A., Ashery, U., Rickmann, M., Augustin, I., Neher, E., Sudhof, T. C., Rettig, J. and Brose, N. (1998) Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron*, **21**, 123-136.
- Betz, W. J. and Bewick, G. S. (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science*, **255**, 200-203.
- Betz, W. J., Bewick, G. S. and Ridge, R. M. (1992) Intracellular movements of fluorescently labeled synaptic vesicles in frog motor nerve terminals during nerve stimulation. *Neuron*, **9**, 805-813.
- Birks, R. and Macintosh, F. C. (1961) Acetylcholine Metabolism of a Sympathetic Ganglion. *Can J Biochem Phys*, **39**, 787-&.
- Bittner, G. D. and Kennedy, D. (1970) Quantitative aspects of transmitter release. *J Cell Biol*, **47**, 585-592.
- Bleckert, A., Photowala, H. and Alford, S. (2012) Dual pools of actin at presynaptic terminals. *J Neurophysiol*, **107**, 3479-3492.
- Bloom, O., Evergren, E., Tomilin, N., Kjaerulff, O., Low, P., Brodin, L., Pieribone, V. A., Greengard, P. and Shupliakov, O. (2003) Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol*, **161**, 737-747.
- Bloom, W. S., Schook, W. and Puszkin, S. (1981) Brain clathrin: ultrastructural and biophysical evidence of reversible assembly. *Mt Sinai J Med*, **48**, 404-411.
- Blumstein, J., Faundez, V., Nakatsu, F., Saito, T., Ohno, H. and Kelly, R. B. (2001a) The neuronal form of adaptor protein-3 is required for synaptic vesicle formation from endosomes. *Journal of Neuroscience*, **21**, 8034-8042.
- Blumstein, J., Faundez, V., Nakatsu, F., Saito, T., Ohno, H. and Kelly, R. B. (2001b) The neuronal form of adaptor protein-3 is required for synaptic vesicle formation from endosomes. *J Neurosci*, **21**, 8034-8042.
- Bonanomi, D., Benfenati, F. and Valtorta, F. (2006) Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle. *Prog Neurobiol*, **80**, 177-217.
- Bonanomi, D., Fornasiero, E. F., Valdez, G., Halegoua, S., Benfenati, F., Menegon, A. and Valtorta, F. (2008) Identification of a developmentally regulated pathway of membrane retrieval in neuronal growth cones. *J Cell Sci*, **121**, 3757-3769.
- Bonhoeffer, T. and Yuste, R. (2002) Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron*, **35**, 1019-1027.
- Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J. C., Ubelmann, F. and Kirchhausen, T. (2011) Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol*, **13**, 1124-1131.

## Bibliografía

- Bozdagi, O., Shan, W., Tanaka, H., Benson, D. L. and Huntley, G. W. (2000) Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron*, **28**, 245-259.
- Branco, T., Marra, V. and Staras, K. (2010) Examining size-strength relationships at hippocampal synapses using an ultrastructural measurement of synaptic release probability. *J Struct Biol*, **172**, 203-210.
- Brenowitz, S. D. and Regehr, W. G. (2007) Reliability and heterogeneity of calcium signaling at single presynaptic boutons of cerebellar granule cells. *J Neurosci*, **27**, 7888-7898.
- Broek, J. A. C., Lin, Z., de Gruiter, H. M. et al. (2016) Synaptic vesicle dynamic changes in a model of fragile X. *Mol Autism*, **7**, 17.
- Brose, N., Petrenko, A. G., Sudhof, T. C. and Jahn, R. (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, **256**, 1021-1025.
- Buffington, S. A., Huang, W. and Costa-Mattioli, M. (2014) Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Annu Rev Neurosci*, **37**, 17-38.
- Burrone, J., Li, Z. and Murthy, V. N. (2006) Studying vesicle cycling in presynaptic terminals using the genetically encoded probe synaptopHluorin. *Nat Protoc*, **1**, 2970-2978.
- Bykhovskaia, M. (2011) Synapsin regulation of vesicle organization and functional pools. *Semin Cell Dev Biol*, **22**, 387-392.
- Castillo, P. E., Younts, T. J., Chavez, A. E. and Hashimoto, Y. (2012) Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, **76**, 70-81.
- Cavolo, S. L., Bulgari, D., Deitcher, D. L. and Levitan, E. S. (2016) Activity Induces Fmr1-Sensitive Synaptic Capture of Anterograde Circulating Neuropeptide Vesicles. *J Neurosci*, **36**, 11781-11787.
- Cingolani, L. A. and Goda, Y. (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 344-356.
- Clayton, E. L., Anggono, V., Smillie, K. J., Chau, N., Robinson, P. J. and Cousin, M. A. (2009) The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurosci*, **29**, 7706-7717.
- Clayton, E. L. and Cousin, M. A. (2009) The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurochem*, **111**, 901-914.
- Clayton, E. L., Evans, G. J. and Cousin, M. A. (2008) Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation. *J Neurosci*, **28**, 6627-6632.
- Clayton, E. L., Minogue, S. and Waugh, M. G. (2013) Phosphatidylinositol 4-kinases and PI4P metabolism in the nervous system: roles in psychiatric and neurological diseases. *Mol Neurobiol*, **47**, 361-372.
- Clayton, E. L., Sue, N., Smillie, K. J. et al. (2010) Dynamin I phosphorylation by GSK3 controls activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *Nat Neurosci*, **13**, 845-851.
- Cole, A. A., Chen, X. and Reese, T. S. (2016) A Network of Three Types of Filaments Organizes Synaptic Vesicles for Storage, Mobilization, and Docking. *J Neurosci*, **36**, 3222-3230.
- Cole, J. C., Villa, B. R. and Wilkinson, R. S. (2000) Disruption of actin impedes transmitter release in snake motor terminals. *J Physiol*, **525 Pt 3**, 579-586.
- Colonnier, M. (1968) Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res*, **9**, 268-287.
- Collado-Alsina, A., Hofmann, F., Sanchez-Prieto, J. and Torres, M. (2017) Altered Synaptic Membrane Retrieval after Strong Stimulation of Cerebellar Granule Neurons in Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase II (cGKII) Knockout Mice. *Int J Mol Sci*, **18**.
- Collado-Alsina, A., Ramirez-Franco, J., Sanchez-Prieto, J. and Torres, M. (2014) The regulation of synaptic vesicle recycling by cGMP-dependent protein kinase type II in cerebellar granule cells under strong and sustained stimulation. *J Neurosci*, **34**, 8788-8799.
- Comery, T. A., Harris, J. B., Willems, P. J., Oostra, B. A., Irwin, S. A., Weiler, I. J. and Greenough, W. T. (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5401-5404.

## Bibliografía

- Connor, S. A., Hoeffler, C. A., Klann, E. and Nguyen, P. V. (2011) Fragile X mental retardation protein regulates heterosynaptic plasticity in the hippocampus. *Learn Mem*, **18**, 207-220.
- Conti, F., DeFelipe, J., Farinas, I. and Manzoni, T. (1989) Glutamate-positive neurons and axon terminals in cat sensory cortex: a correlative light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*, **290**, 141-153.
- Conti, F., Rustioni, A., Petrusz, P. and Towle, A. C. (1987) Glutamate-positive neurons in the somatic sensory cortex of rats and monkeys. *J Neurosci*, **7**, 1887-1901.
- Cory, G. O. and Ridley, A. J. (2002) Cell motility: braking WAVES. *Nature*, **418**, 732-733.
- Cousin, M. A. (2008) Use of FM1-43 and other derivatives to investigate neuronal function. *Curr Protoc Neurosci*, **Chapter 2**, Unit 2 6.
- Cousin, M. A. (2015) Synaptic Vesicle Endocytosis and Endosomal Recycling in Central Nerve Terminals: Discrete Trafficking Routes? *Neuroscientist*, **21**, 413-423.
- Cousin, M. A. (2017) Integration of Synaptic Vesicle Cargo Retrieval with Endocytosis at Central Nerve Terminals. *Front Cell Neurosci*, **11**, 234.
- Cremona, O. and De Camilli, P. (2001) Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J Cell Sci*, **114**, 1041-1052.
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R. et al. (1999) Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*, **99**, 179-188.
- Chadderton, P., Margrie, T. W. and Hausser, M. (2004) Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing. *Nature*, **428**, 856-860.
- Chandrasekar, I., Goeckeler, Z. M., Turney, S. G., Wang, P., Wysolmerski, R. B., Adelstein, R. S. and Bridgman, P. C. (2014) Nonmuscle myosin II is a critical regulator of clathrin-mediated endocytosis. *Traffic*, **15**, 418-432.
- Chappie, J. S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S. L. and Dyda, F. (2010) G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature*, **465**, 435-440.
- Chappie, J. S., Mears, J. A., Fang, S., Leonard, M., Schmid, S. L., Milligan, R. A., Hinshaw, J. E. and Dyda, F. (2011) A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell*, **147**, 209-222.
- Chazeau, A. and Giannone, G. (2016) Organization and dynamics of the actin cytoskeleton during dendritic spine morphological remodeling. *Cell Mol Life Sci*, **73**, 3053-3073.
- Chen, L. Y., Rex, C. S., Babayan, A. H., Kramar, E. A., Lynch, G., Gall, C. M. and Lauterborn, J. C. (2010) Physiological activation of synaptic Rac>PAK (p-21 activated kinase) signaling is defective in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*, **30**, 10977-10984.
- Cheung, G. and Cousin, M. A. (2012) Adaptor protein complexes 1 and 3 are essential for generation of synaptic vesicles from activity-dependent bulk endosomes. *J Neurosci*, **32**, 6014-6023.
- Cheung, G. and Cousin, M. A. (2013) Synaptic vesicle generation from activity-dependent bulk endosomes requires calcium and calcineurin. *J Neurosci*, **33**, 3370-3379.
- Chi, P., Greengard, P. and Ryan, T. A. (2001) Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity. *Nat Neurosci*, **4**, 1187-1193.
- Chi, P., Greengard, P. and Ryan, T. A. (2003) Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. *Neuron*, **38**, 69-78.
- Chmielewska, J. J., Kuzniewska, B., Milek, J., Urbanska, K. and Dziembowska, M. (2018) Neuroligin 1, 2, and 3 Regulation at the Synapse: FMRP-Dependent Translation and Activity-Induced Proteolytic Cleavage. *Mol Neurobiol*.
- Choi, C. H., Schoenfeld, B. P., Weisz, E. D. et al. (2015) PDE-4 inhibition rescues aberrant synaptic plasticity in Drosophila and mouse models of fragile X syndrome. *J Neurosci*, **35**, 396-408.
- Danglot, L. and Galli, T. (2007) What is the function of neuronal AP-3? *Biol Cell*, **99**, 349-361.

## Bibliografía

- Darcy, K. J., Staras, K., Collinson, L. M. and Goda, Y. (2006) An ultrastructural readout of fluorescence recovery after photobleaching using correlative light and electron microscopy. *Nat Protoc*, **1**, 988-994.
- Darnell, J. C. and Klann, E. (2013) The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. *Nat Neurosci*, **16**, 1530-1536.
- Dason, J. S., Smith, A. J., Marin, L. and Charlton, M. P. (2014) Cholesterol and F-actin are required for clustering of recycling synaptic vesicle proteins in the presynaptic plasma membrane. *J Physiol*, **592**, 621-633.
- Davydova, D., Marini, C., King, C. et al. (2014) Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca(2+) channels via RIM-binding protein. *Neuron*, **82**, 181-194.
- DeFelipe, J., Conti, F., Van Eyck, S. L. and Manzoni, T. (1988) Demonstration of glutamate-positive axon terminals forming asymmetric synapses in cat neocortex. *Brain Res*, **455**, 162-165.
- DeFelipe, J. and Jones, E. G. (1992) High-Resolution Light and Electron Microscopic Immunocytochemistry of Colocalized GABA and Calbindin D-28k in Somata and Double Bouquet Cell Axons of Monkey Somatosensory Cortex. *Eur J Neurosci*, **4**, 46-60.
- DeFelipe, J., Segura, T., Arellano, J. I. et al. (2001) Neuropathological findings in a patient with epilepsy and the Parry-Romberg syndrome. *Epilepsia*, **42**, 1198-1203.
- Delvendahl, I., Vyleta, N. P., von Gersdorff, H. and Hallermann, S. (2016) Fast, Temperature-Sensitive and Clathrin-Independent Endocytosis at Central Synapses. *Neuron*, **90**, 492-498.
- Deng, P. Y., Rotman, Z., Blundon, J. A., Cho, Y., Cui, J., Cavalli, V., Zakharenko, S. S. and Klyachko, V. A. (2013) FMRP regulates neurotransmitter release and synaptic information transmission by modulating action potential duration via BK channels. *Neuron*, **77**, 696-711.
- Deng, P. Y., Sojka, D. and Klyachko, V. A. (2011) Abnormal presynaptic short-term plasticity and information processing in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*, **31**, 10971-10982.
- Denker, A., Bethani, I., Krohnert, K. et al. (2011a) A small pool of vesicles maintains synaptic activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 17177-17182.
- Denker, A., Krohnert, K., Buckers, J., Neher, E. and Rizzoli, S. O. (2011b) The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 17183-17188.
- Denker, A. and Rizzoli, S. O. (2010) Synaptic vesicle pools: an update. *Front Synaptic Neurosci*, **2**, 135.
- Derivery, E. and Gautreau, A. (2010) Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *Bioessays*, **32**, 119-131.
- Derobertis, E. D. P. and Bennett, H. S. (1955) Some Features of the Submicroscopic Morphology of Synapses in Frog and Earthworm. *J Biophys Biochem Cy*, **1**, 47-&.
- Dillon, C. and Goda, Y. (2005) The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci*, **28**, 25-55.
- Diril, M. K., Wienisch, M., Jung, N., Klingauf, J. and Haucke, V. (2006) Stonin 2 is an AP-2-dependent endocytic sorting adaptor for synaptotagmin internalization and recycling. *Dev Cell*, **10**, 233-244.
- Dolan, B. M., Duron, S. G., Campbell, D. A. et al. (2013) Rescue of fragile X syndrome phenotypes in Fmr1 KO mice by the small-molecule PAK inhibitor FRAX486. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 5671-5676.
- Dorostkar, M. M., Dreosti, E., Odermatt, B. and Lagnado, L. (2010) Computational processing of optical measurements of neuronal and synaptic activity in networks. *J Neurosci Methods*, **188**, 141-150.

## Bibliografía

- Dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A. and Nosworthy, N. J. (2003) Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological Reviews*, **83**, 433-473.
- Doussau, F. and Augustine, G. J. (2000) The actin cytoskeleton and neurotransmitter release: An overview. *Biochimie*, **82**, 353-363.
- Dresbach, T., Hempelmann, A., Spilker, C., tom Dieck, S., Altmann, W. D., Zuschratter, W., Garner, C. C. and Gundelfinger, E. D. (2003) Functional regions of the presynaptic cytomatrix protein bassoon: significance for synaptic targeting and cytomatrix anchoring. *Mol Cell Neurosci*, **23**, 279-291.
- Dresbach, T., Qualmann, B., Kessels, M. M., Garner, C. C. and Gundelfinger, E. D. (2001) The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 94-116.
- Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Sudhof, T. C. and Rizo, J. (2005) A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J*, **24**, 2839-2850.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T. C. and Rizo, J. (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J*, **18**, 4372-4382.
- Eguchi, K., Nakanishi, S., Takagi, H., Taoufiq, Z. and Takahashi, T. (2012) Maturation of a PKG-dependent retrograde mechanism for exoendocytic coupling of synaptic vesicles. *Neuron*, **74**, 517-529.
- Espinosa, J. S. and Luo, L. (2008) Timing neurogenesis and differentiation: Insights from quantitative clonal analyses of cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience*, **28**, 2301-2312.
- Evergren, E., Benfenati, F. and Shupliakov, O. (2007) The synapsin cycle: a view from the synaptic endocytic zone. *J Neurosci Res*, **85**, 2648-2656.
- Evergren, E., Marcucci, M., Tomilin, N. et al. (2004) Amphiphysin is a component of clathrin coats formed during synaptic vesicle recycling at the lamprey giant synapse. *Traffic*, **5**, 514-528.
- Evstratova, A., Chamberland, S., Faundez, V. and Toth, K. (2014) Vesicles derived via AP-3-dependent recycling contribute to asynchronous release and influence information transfer. *Nat Commun*, **5**, 5530.
- Fairen, A., Peters, A. and Saldanha, J. (1977) A new procedure for examining Golgi impregnated neurons by light and electron microscopy. *J Neurocytol*, **6**, 311-337.
- Fairen, A. and Valverde, F. (1979) Specific thalamo-cortical afferents and their presumptive targets in the visual cortex. A Golgi study. *Prog Brain Res*, **51**, 419-438.
- Fasshauer, D., Eliason, W. K., Brunger, A. T. and Jahn, R. (1998) Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry*, **37**, 10354-10362.
- Faundez, V., Horng, J. T. and Kelly, R. B. (1998) A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell*, **93**, 423-432.
- Fei, H., Grygoruk, A., Brooks, E. S., Chen, A. and Krantz, D. E. (2008) Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traffic*, **9**, 1425-1436.
- Feldman, M. L. and Peters, A. (1978) The forms of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat. *J Comp Neurol*, **179**, 761-793.
- Fenster, S. D., Kessels, M. M., Qualmann, B., Chung, W. J., Nash, J., Gundelfinger, E. D. and Garner, C. C. (2003) Interactions between Piccolo and the actin/dynamin-binding protein Abp1 link vesicle endocytosis to presynaptic active zones. *J Biol Chem*, **278**, 20268-20277.
- Ferguson, S. M., Brasnjo, G., Hayashi, M. et al. (2007) A selective activity-dependent requirement for dynamin I in synaptic vesicle endocytosis. *Science*, **316**, 570-574.
- Ferguson, S. M. and De Camilli, P. (2012) Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 75-88.

## Bibliografía

- Fernandez-Alfonso, T. and Ryan, T. A. (2004) The kinetics of synaptic vesicle pool depletion at CNS synaptic terminals. *Neuron*, **41**, 943-953.
- Fernandez-Alfonso, T. and Ryan, T. A. (2008) A heterogeneous "resting" pool of synaptic vesicles that is dynamically interchanged across boutons in mammalian CNS synapses. *Brain Cell Biol*, **36**, 87-100.
- Fernandez-Busnadiego, R., Zuber, B., Maurer, U. E., Cyrklaff, M., Baumeister, W. and Lucic, V. (2010) Quantitative analysis of the native presynaptic cytomatrix by cryoelectron tomography. *J Cell Biol*, **188**, 145-156.
- Ferron, L., Nieto-Rostro, M., Cassidy, J. S. and Dolphin, A. C. (2014) Fragile X mental retardation protein controls synaptic vesicle exocytosis by modulating N-type calcium channel density. *Nat Commun*, **5**, 3628.
- Fioravante, D. and Regehr, W. G. (2011) Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, **21**, 269-274.
- Foldy, C., Malenka, R. C. and Sudhof, T. C. (2013) Autism-associated neuroligin-3 mutations commonly disrupt tonic endocannabinoid signaling. *Neuron*, **78**, 498-509.
- Ford, M. G., Jenni, S. and Nunnari, J. (2011) The crystal structure of dynamin. *Nature*, **477**, 561-566.
- Ford, M. G., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J., Evans, P. R. and McMahon, H. T. (2002) Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, **419**, 361-366.
- Fornasiero, E. F., Raimondi, A., Guarnieri, F. C., Orlando, M., Fesce, R., Benfenati, F. and Valtorta, F. (2012) Synapsins contribute to the dynamic spatial organization of synaptic vesicles in an activity-dependent manner. *J Neurosci*, **32**, 12214-12227.
- Foss, S. M., Li, H., Santos, M. S., Edwards, R. H. and Voglmaier, S. M. (2013) Multiple dileucine-like motifs direct VGLUT1 trafficking. *J Neurosci*, **33**, 10647-10660.
- Fowler, M. W. and Staras, K. (2015) Synaptic vesicle pools: Principles, properties and limitations. *Exp Cell Res*, **335**, 150-156.
- Fredj, N. B. and Burrone, J. (2009) A resting pool of vesicles is responsible for spontaneous vesicle fusion at the synapse. *Nat Neurosci*, **12**, 751-758.
- Fremeau, R. T., Jr., Troyer, M. D., Pahner, I. et al. (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, **31**, 247-260.
- Gaffield, M. A., Rizzoli, S. O. and Betz, W. J. (2006) Mobility of synaptic vesicles in different pools in resting and stimulated frog motor nerve terminals. *Neuron*, **51**, 317-325.
- Galvez, R. and Greenough, W. T. (2005) Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. *Am J Med Genet A*, **135**, 155-160.
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balazs, R. and Jorgensen, O. S. (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*, **7**, 2203-2213.
- Garey, L. J., Ong, W. Y., Patel, T. S., Kanani, M., Davis, A., Mortimer, A. M., Barnes, T. R. and Hirsch, S. R. (1998) Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **65**, 446-453.
- Geinisman, Y. (2000) Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. *Cereb Cortex*, **10**, 952-962.
- Geinisman, Y., Berry, R. W., Disterhoft, J. F., Power, J. M. and Van der Zee, E. A. (2001) Associative learning elicits the formation of multiple-synapse boutons. *J Neurosci*, **21**, 5568-5573.
- Geng, J., Wang, L., Lee, J. Y., Chen, C. K. and Chang, K. T. (2016) Phosphorylation of Synaptojanin Differentially Regulates Endocytosis of Functionally Distinct Synaptic Vesicle Pools. *J Neurosci*, **36**, 8882-8894.
- Gennerich, A. and Vale, R. D. (2009) Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Curr Opin Cell Biol*, **21**, 59-67.
- Gilbert, C. D. and Kelly, J. P. (1975) The projections of cells in different layers of the cat's visual cortex. *J Comp Neurol*, **163**, 81-105.

## Bibliografía

- Gimber, N., Tadeus, G., Maritzen, T., Schmoranzer, J. and Haucke, V. (2015) Diffusional spread and confinement of newly exocytosed synaptic vesicle proteins. *Nat Commun*, **6**, 8392.
- Glantz, L. A. and Lewis, D. A. (2000) Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, **57**, 65-73.
- Gomis-Gonzalez, M., Busquets-Garcia, A., Matute, C., Maldonado, R., Mato, S. and Ozaita, A. (2016) Possible Therapeutic Doses of Cannabinoid Type 1 Receptor Antagonist Reverses Key Alterations in Fragile X Syndrome Mouse Model. *Genes (Basel)*, **7**.
- Gonzalez-Forero, D., Montero, F., Garcia-Morales, V., Dominguez, G., Gomez-Perez, L., Garcia-Verdugo, J. M. and Moreno-Lopez, B. (2012) Endogenous Rho-kinase signaling maintains synaptic strength by stabilizing the size of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *J Neurosci*, **32**, 68-84.
- Gordon, S. L. and Cousin, M. A. (2013) X-linked intellectual disability-associated mutations in synaptophysin disrupt synaptobrevin II retrieval. *J Neurosci*, **33**, 13695-13700.
- Gordon, S. L. and Cousin, M. A. (2016) The iTRAPs: Guardians of Synaptic Vesicle Cargo Retrieval During Endocytosis. *Front Synaptic Neurosci*, **8**, 1.
- Gordon, S. L., Harper, C. B., Smillie, K. J. and Cousin, M. A. (2016) A Fine Balance of Synaptophysin Levels Underlies Efficient Retrieval of Synaptobrevin II to Synaptic Vesicles. *PLoS One*, **11**, e0149457.
- Gormal, R. S., Nguyen, T. H., Martin, S., Papadopulos, A. and Meunier, F. A. (2015) An actomyosin II constricting ring initiates the fission of activity-dependent bulk endosomes in neurosecretory cells. *J Neurosci*, **35**, 1380-1389.
- Grabenbauer, M. (2012) Correlative light and electron microscopy of GFP. *Methods Cell Biol*, **111**, 117-138.
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S. J. and Lagnado, L. (2006) Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron*, **51**, 773-786.
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S. J. and Lagnado, L. (2007) Clathrin-mediated endocytosis: the physiological mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *J Physiol*, **585**, 681-686.
- Grant, B. D. and Donaldson, J. G. (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 597-608.
- Grassart, A., Cheng, A. T., Hong, S. H. et al. (2014) Actin and dynamin2 dynamics and interplay during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, **205**, 721-735.
- Gray, E. G. (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat*, **93**, 420-433.
- Greengard, P., Benfenati, F. and Valtorta, F. (1994) Synapsin I, an actin-binding protein regulating synaptic vesicle traffic in the nerve terminal. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **29**, 31-45.
- Gross, C., Chang, C. W., Kelly, S. M. et al. (2015) Increased Expression of the PI3K Enhancer PIKE Mediates Deficits in Synaptic Plasticity and Behavior in Fragile X Syndrome. *Cell Reports*, **11**, 727-736.
- Guan, R., Dai, H., Harrison, S. C. and Kirchhausen, T. (2010) Structure of the PTEN-like region of auxilin, a detector of clathrin-coated vesicle budding. *Structure*, **18**, 1191-1198.
- Gundelfinger, E. D., Reissner, C. and Garner, C. C. (2015) Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone. *Front Synaptic Neurosci*, **7**, 19.
- Hagerman, R. J., Berry-Kravis, E., Kaufmann, W. E. et al. (2009) Advances in the treatment of fragile X syndrome. *Pediatrics*, **123**, 378-390.
- Harata, N., Ryan, T. A., Smith, S. J., Buchanan, J. and Tsien, R. W. (2001) Visualizing recycling synaptic vesicles in hippocampal neurons by FM 1-43 photoconversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12748-12753.

## Bibliografía

- Hasbani, M. J., Schlieff, M. L., Fisher, D. A. and Goldberg, M. P. (2001) Dendritic spines lost during glutamate receptor activation reemerge at original sites of synaptic contact. *J Neurosci*, **21**, 2393-2403.
- Hashimoto, M. and Hibi, M. (2012) Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Dev Growth Differ*, **54**, 373-389.
- Hata, K., Polo-Parada, L. and Landmesser, L. T. (2007) Selective targeting of different neural cell adhesion molecule isoforms during motoneuron myotube synapse formation in culture and the switch from an immature to mature form of synaptic vesicle cycling. *J Neurosci*, **27**, 14481-14493.
- Hata, Y., Slaughter, C. A. and Sudhof, T. C. (1993) Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature*, **366**, 347-351.
- Haucke, V. and De Camilli, P. (1999) AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science*, **285**, 1268-1271.
- Hayashida, M., Tanifuji, S., Ma, H., Murakami, N. and Mochida, S. (2015) Neural activity selects myosin IIB and VI with a specific time window in distinct dynamin isoform-mediated synaptic vesicle reuse pathways. *J Neurosci*, **35**, 8901-8913.
- Henkel, A. W. and Betz, W. J. (1995) Monitoring of black widow spider venom (BWSV) induced exo- and endocytosis in living frog motor nerve terminals with FM1-43. *Neuropharmacology*, **34**, 1397-1406.
- Hernandez, K., Swiatkowski, P., Patel, M. V., Liang, C., Dudzinski, N. R., Brzustowicz, L. M. and Firestein, B. L. (2016) Overexpression of Isoforms of Nitric Oxide Synthase I Adaptor Protein, Encoded by a Risk Gene for Schizophrenia, Alters Actin Dynamics and Synaptic Function. *Front Cell Neurosci*, **10**, 6.
- Herzog, E., Bellenchi, G. C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B. and El Mestikawy, S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci*, **21**, RC181.
- Heuser, J. (1989) Effects of cytoplasmic acidification on clathrin lattice morphology. *J Cell Biol*, **108**, 401-411.
- Heuser, J. E. and Reese, T. S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, **57**, 315-344.
- Hirokawa, N. (1989) The Arrangement of Actin-Filaments in the Postsynaptic Cytoplasm of the Cerebellar Cortex Revealed by Quick-Freeze Deep-Etch Electron-Microscopy. *Neurosci Res*, **6**, 269-275.
- Ho, V. M., Lee, J. A. and Martin, K. C. (2011) The cell biology of synaptic plasticity. *Science*, **334**, 623-628.
- Hoeffler, C. A. and Klann, E. (2010) mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci*, **33**, 67-75.
- Holt, M., Cooke, A., Wu, M. M. and Lagnado, L. (2003) Bulk membrane retrieval in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *J Neurosci*, **23**, 1329-1339.
- Hua, Z., Leal-Ortiz, S., Foss, S. M., Waites, C. L., Garner, C. C., Voglmaier, S. M. and Edwards, R. H. (2011) v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools. *Neuron*, **71**, 474-487.
- Hubel, D. H. and Wiesel, T. N. (1969) Anatomical demonstration of columns in the monkey striate cortex. *Nature*, **221**, 747-750.
- Huber, K. M., Klann, E., Costa-Mattioli, M. and Zukin, R. S. (2015) Dysregulation of Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Mouse Models of Autism. *J Neurosci*, **35**, 13836-13842.
- Hussain, N. K., Jenna, S., Glogauer, M. et al. (2001) Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol*, **3**, 927-932.
- Imig, C., Min, S. W., Krinner, S., Arancillo, M., Rosenmund, C., Sudhof, T. C., Rhee, J., Brose, N. and Cooper, B. H. (2014) The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones. *Neuron*, **84**, 416-431.

## Bibliografía

- Irwin, S. A., Galvez, R. and Greenough, W. T. (2000) Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cereb Cortex*, **10**, 1038-1044.
- Irwin, S. A., Idupulapati, M., Gilbert, M. E. et al. (2002) Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V pyramidal neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice. *Am J Med Genet*, **111**, 140-146.
- Irwin, S. A., Patel, B., Idupulapati, M. et al. (2001) Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *Am J Med Genet*, **98**, 161-167.
- Ito, M. (1989) Long-term depression. *Annu Rev Neurosci*, **12**, 85-102.
- Ito, M. (2001) Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev*, **81**, 1143-1195.
- Ito, M. (2002) The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 896-902.
- Ito, M. (2008) Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 304-313.
- Itoh, T. and De Camilli, P. (2006) BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 897-912.
- Jacobson, S. and Trojanowski, J. Q. (1975) Corticothalamic neurons and thalamocortical terminal fields: an investigation in rat using horseradish peroxidase and autoradiography. *Brain Res*, **85**, 385-401.
- Jahn, R. and Fasshauer, D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, **490**, 201-207.
- Jahn, R. and Scheller, R. H. (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 631-643.
- Jorntell, H. and Ekerot, C. F. (2006) Properties of somatosensory synaptic integration in cerebellar granule cells in vivo. *J Neurosci*, **26**, 11786-11797.
- Jovanovic, J. N., Sihra, T. S., Nairn, A. C., Hemmings, H. C., Jr., Greengard, P. and Czernik, A. J. (2001) Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *J Neurosci*, **21**, 7944-7953.
- Jung, K. M., Sepers, M., Henstridge, C. M. et al. (2012) Uncoupling of the endocannabinoid signalling complex in a mouse model of fragile X syndrome. *Nat Commun*, **3**, 1080.
- Jurado, S., Sanchez-Prieto, J. and Torres, M. (2003) Differential expression of NO-sensitive guanylyl cyclase subunits during the development of rat cerebellar granule cells: regulation via N-methyl-D-aspartate receptors. *J Cell Sci*, **116**, 3165-3175.
- Kaesler, P. S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J. and Sudhof, T. C. (2011) RIM proteins tether Ca<sup>2+</sup> channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell*, **144**, 282-295.
- Kaesler, P. S. and Regehr, W. G. (2017) The readily releasable pool of synaptic vesicles. *Curr Opin Neurobiol*, **43**, 63-70.
- Kaksonen, M., Sun, Y. and Drubin, D. G. (2003) A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell*, **115**, 475-487.
- Kandel, E. R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. (2000) Principles of Neuronal Science. McGraw-Hill, Health Professions Division, New York.
- Kaufmann, W. E. and Moser, H. W. (2000) Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex*, **10**, 981-991.
- Kavalali, E. T. (2006) Synaptic vesicle reuse and its implications. *Neuroscientist*, **12**, 57-66.
- Kavalali, E. T. and Jorgensen, E. M. (2014) Visualizing presynaptic function. *Nat Neurosci*, **17**, 10-16.
- Kelleher, R. J., 3rd and Bear, M. F. (2008) The autistic neuron: troubled translation? *Cell*, **135**, 401-406.

## Bibliografía

- Khelifaoui, M., Pavlowsky, A., Powell, A. D. *et al.* (2009) Inhibition of RhoA pathway rescues the endocytosis defects in OligophreninI mouse model of mental retardation. *Hum Mol Genet*, **18**, 2575-2583.
- Kim, S. H. and Ryan, T. A. (2009) Synaptic vesicle recycling at CNS synapses without AP-2. *J Neurosci*, **29**, 3865-3874.
- Kim, S. H. and Ryan, T. A. (2010) CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron*, **67**, 797-809.
- Kim, S. H. and Ryan, T. A. (2013) Balance of calcineurin Aalpha and CDK5 activities sets release probability at nerve terminals. *J Neurosci*, **33**, 8937-8950.
- Kisvarday, Z. F., Cowey, A. and Somogyi, P. (1986) Synaptic relationships of a type of GABA-immunoreactive neuron (clutch cell), spiny stellate cells and lateral geniculate nucleus afferents in layer IVC of the monkey striate cortex. *Neuroscience*, **19**, 741-761.
- Klemmer, P., Meredith, R. M., Holmgren, C. D. *et al.* (2011) Proteomics, ultrastructure, and physiology of hippocampal synapses in a fragile X syndrome mouse model reveal presynaptic phenotype. *J Biol Chem*, **286**, 25495-25504.
- Kokotos, A. C. and Low, D. W. (2015) Myosin II and dynamin control actin rings to mediate fission during activity-dependent bulk endocytosis. *J Neurosci*, **35**, 8687-8688.
- Kononenko, N. L., Diril, M. K., Puchkov, D. *et al.* (2013) Compromised fidelity of endocytic synaptic vesicle protein sorting in the absence of stonin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, E526-535.
- Kononenko, N. L. and Haucke, V. (2015) Molecular mechanisms of presynaptic membrane retrieval and synaptic vesicle reformation. *Neuron*, **85**, 484-496.
- Kononenko, N. L., Puchkov, D., Classen, G. A. *et al.* (2014) Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron*, **82**, 981-988.
- Korber, C., Horstmann, H., Satzler, K. and Kuner, T. (2012) Endocytic structures and synaptic vesicle recycling at a central synapse in awake rats. *Traffic*, **13**, 1601-1611.
- Krueger, D. D., Tuffy, L. P., Papadopoulos, T. and Brose, N. (2012) The role of neurexins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses. *Curr Opin Neurobiol*, **22**, 412-422.
- Kubo, T., Yamaguchi, A., Iwata, N. and Yamashita, T. (2008) The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders. *Ther Clin Risk Manag*, **4**, 605-615.
- Kuromi, H. and Kidokoro, Y. (1998) Two distinct pools of synaptic vesicles in single presynaptic boutons in a temperature-sensitive *Drosophila* mutant, shibire. *Neuron*, **20**, 917-925.
- Kuromi, H. and Kidokoro, Y. (1999) The optically determined size of exo/endo cycling vesicle pool correlates with the quantal content at the neuromuscular junction of *Drosophila* larvae. *J Neurosci*, **19**, 1557-1565.
- Lee, K., Elliott, H. L., Oak, Y., Zee, C. T., Groisman, A., Tytell, J. D. and Danuser, G. (2015) Functional hierarchy of redundant actin assembly factors revealed by fine-grained registration of intrinsic image fluctuations. *Cell Syst*, **1**, 37-50.
- LeVay, S. (1973) Synaptic patterns in the visual cortex of the cat and monkey. Electron microscopy of Golgi preparations. *J Comp Neurol*, **150**, 53-85.
- Li, L., Wu, X., Yue, H. Y., Zhu, Y. C. and Xu, J. (2016) Myosin light chain kinase facilitates endocytosis of synaptic vesicles at hippocampal boutons. *J Neurochem*, **138**, 60-73.
- Li, Y. C., Chanaday, N. L., Xu, W. and Kavalali, E. T. (2017) Synaptotagmin-I- and Synaptotagmin-7-Dependent Fusion Mechanisms Target Synaptic Vesicles to Kinetically Distinct Endocytic Pathways. *Neuron*, **93**, 616-631 e613.
- Li, Z. and Murthy, V. N. (2001) Visualizing postendocytic traffic of synaptic vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, **31**, 593-605.
- Limbach, C., Laue, M. M., Wang, X., Hu, B., Thiede, N., Hultqvist, G. and Kilimann, M. W. (2011) Molecular in situ topology of Aczonin/Piccolo and associated proteins at the mammalian neurotransmitter release site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, E392-401.

## Bibliografía

- Liu, S., Xiong, X., Zhao, X., Yang, X. and Wang, H. (2015) F-BAR family proteins, emerging regulators for cell membrane dynamic changes-from structure to human diseases. *J Hematol Oncol*, **8**, 47.
- Loebrich, S. (2014) The role of F-actin in modulating Clathrin-mediated endocytosis: Lessons from neurons in health and neuropsychiatric disorder. *Commun Integr Biol*, **7**, e28740.
- Lopez-Jimenez, M. E., Bartolome-Martin, D., Sanchez-Prieto, J. and Torres, M. (2009) Suppression of guanylyl cyclase (beta I subunit) expression impairs neurite outgrowth and synapse maturation in cultured cerebellar granule cells. *Cell Death Differ*, **16**, 1266-1278.
- Lorente de Nó, R. (1922) La corteza cerebral de ratón. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid*, **20**, 41-78.
- Lorente de Nó, R. (1934) Studies on the structure of cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol*, **46**, 113-177.
- Lorente de Nó, R. (1949) Cerebral cortex: architecture, intracortical connections, motor projections. *Fulton's Physiology of the Nervous System*, 288-300.
- Lund, J. S. (1973) Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the monkey (Macaca mulatta). *J Comp Neurol*, **147**, 455-496.
- Marco, P. and DeFelipe, J. (1997) Altered synaptic circuitry in the human temporal neocortex removed from epileptic patients. *Experimental Brain Research*, **114**, 1-10.
- Marco, P., Sola, R. G., Pulido, P., Aljarde, M. T., Sanchez, A., Cajal, S. R. Y. and DeFelipe, J. (1996) Inhibitory neurons in the human epileptogenic temporal neocortex - An immunocytochemical study. *Brain*, **119**, 1327-1347.
- Marra, V., Burden, J. J., Thorpe, J. R., Smith, I. T., Smith, S. L., Hausser, M., Branco, T. and Staras, K. (2012) A preferentially segregated recycling vesicle pool of limited size supports neurotransmission in native central synapses. *Neuron*, **76**, 579-589.
- Matsui, K. and Jahr, C. E. (2003) Ectopic release of synaptic vesicles. *Neuron*, **40**, 1173-1183.
- Matsui, K., Jahr, C. E. and Rubio, M. E. (2005) High-concentration rapid transients of glutamate mediate neural-glia communication via ectopic release. *J Neurosci*, **25**, 7538-7547.
- McFadden et al., H. X., Yihui Cui, Rebecca A. Piskorowski, Christophe Leterrier, Diana Zala, Laurent Venance, Vivien Chevalyere, Zsolt Lenkei (2018) Actomyosin-mediated nanostructural remodeling of the presynaptic vesicle pool by cannabinoids induces long-term depression. *bioRxiv*, **Preprint (unpublished)**.
- Maurin, T., Zongaro, S. and Bardoni, B. (2014) Fragile X Syndrome: from molecular pathology to therapy. *Neurosci Biobehav Rev*, **46 Pt 2**, 242-255.
- McMahon, H. T., Kozlov, M. M. and Martens, S. (2010) Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell*, **140**, 601-605.
- McMahon, H. T., Missler, M., Li, C. and Sudhof, T. C. (1995) Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell*, **83**, 111-119.
- Meijering, E., Jacob, M., Sarria, J. C., Steiner, P., Hirling, H. and Unser, M. (2004) Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A*, **58**, 167-176.
- Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V. et al. (2002) Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron*, **35**, 121-133.
- Merrifield, C. J., Moss, S. E., Ballestrom, C., Imhof, B. A., Giese, G., Wunderlich, I. and Almers, W. (1999) Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol*, **1**, 72-74.
- Michaelsen-Preusse, K., Feuge, J. and Korte, M. (2018) Imbalance of synaptic actin dynamics as a key to fragile X syndrome? *J Physiol*.
- Michaelsen-Preusse, K., Zessin, S., Grigoryan, G., Scharkowski, F., Feuge, J., Remus, A. and Korte, M. (2016) Neuronal profilins in health and disease: Relevance for spine plasticity and Fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **113**, 3365-3370.
- Michel, K., Muller, J. A., Oprisoreanu, A. M. and Schoch, S. (2015) The presynaptic active zone: A dynamic scaffold that regulates synaptic efficacy. *Exp Cell Res*, **335**, 157-164.

## Bibliografía

- Micheva, K. D., Buchanan, J., Holz, R. W. and Smith, S. J. (2003) Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci*, **6**, 925-932.
- Micheva, K. D. and Smith, S. J. (2005) Strong effects of subphysiological temperature on the function and plasticity of mammalian presynaptic terminals. *J Neurosci*, **25**, 7481-7488.
- Miesenbock, G., De Angelis, D. A. and Rothman, J. E. (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, **394**, 192-195.
- Miklavc, P., Ehinger, K., Sultan, A., Felder, T., Paul, P., Gottschalk, K. E. and Frick, M. (2015) Actin depolymerisation and crosslinking join forces with myosin II to contract actin coats on fused secretory vesicles. *J Cell Sci*, **128**, 1193-1203.
- Milovanovic, D. and De Camilli, P. (2017) Synaptic Vesicle Clusters at Synapses: A Distinct Liquid Phase? *Neuron*, **93**, 995-1002.
- Miller, S. E., Sahlender, D. A., Graham, S. C., Honing, S., Robinson, M. S., Peden, A. A. and Owen, D. J. (2011) The molecular basis for the endocytosis of small R-SNAREs by the clathrin adaptor CALM. *Cell*, **147**, 1118-1131.
- Momboisse, F., Houy, S., Ory, S., Calco, V., Bader, M. F. and Gasman, S. (2011) How important are Rho GTPases in neurosecretion? *J Neurochem*, **117**, 623-631.
- Morales, M., Colicos, M. A. and Goda, Y. (2000) Actin-dependent regulation of neurotransmitter release at central synapses. *Neuron*, **27**, 539-550.
- Mountcastle, V. B. and Powell, T. P. (1959) Neural mechanisms subserving cutaneous sensibility, with special reference to the role of afferent inhibition in sensory perception and discrimination. *Bull Johns Hopkins Hosp*, **105**, 201-232.
- Multani, P., Myers, R. H., Blume, H. W., Schomer, D. L. and Sotrel, A. (1994) Neocortical dendritic pathology in human partial epilepsy: a quantitative Golgi study. *Epilepsia*, **35**, 728-736.
- Murase, S., Mosser, E. and Schuman, E. M. (2002) Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron*, **35**, 91-105.
- Murthy, V. N., Sejnowski, T. J. and Stevens, C. F. (1997) Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron*, **18**, 599-612.
- Nelson, D. L., Orr, H. T. and Warren, S. T. (2013) The unstable repeats--three evolving faces of neurological disease. *Neuron*, **77**, 825-843.
- Nguyen, T. H., Maucort, G., Sullivan, R. K., Schenning, M., Lavidis, N. A., McCluskey, A., Robinson, P. J. and Meunier, F. A. (2012) Actin- and dynamin-dependent maturation of bulk endocytosis restores neurotransmission following synaptic depletion. *PLoS One*, **7**, e36913.
- Nicholson-Fish, J. C., Kokotos, A. C., Gillingwater, T. H., Smillie, K. J. and Cousin, M. A. (2015) VAMP4 Is an Essential Cargo Molecule for Activity-Dependent Bulk Endocytosis. *Neuron*, **88**, 973-984.
- Nicholson-Fish, J. C., Smillie, K. J. and Cousin, M. A. (2016) Monitoring activity-dependent bulk endocytosis with the genetically-encoded reporter VAMP4-pHluorin. *J Neurosci Methods*, **266**, 1-10.
- Nimchinsky, E. A., Oberlander, A. M. and Svoboda, K. (2001) Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci*, **21**, 5139-5146.
- Nolze, A., Schneider, J., Keil, R., Lederer, M., Huttelmaier, S., Kessels, M. M., Qualmann, B. and Hatzfeld, M. (2013) FMRP regulates actin filament organization via the armadillo protein p0071. *RNA*, **19**, 1483-1496.
- O'Leary, J. L. (1941) Structure of the area striata of the cat. *Journal of Comparative Neurology*, **75**, 131-164.
- Olavarria, J. and Van Sluyters, R. C. (1985) Organization and postnatal development of callosal connections in the visual cortex of the rat. *J Comp Neurol*, **239**, 1-26.
- Olmos-Serrano, J. L., Paluszkiwicz, S. M., Martin, B. S., Kaufmann, W. E., Corbin, J. G. and Huntsman, M. M. (2010) Defective GABAergic neurotransmission and pharmacological

## Bibliografía

- rescue of neuronal hyperexcitability in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*, **30**, 9929-9938.
- Omote, H., Miyaji, T., Juge, N. and Moriyama, Y. (2011) Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry*, **50**, 5558-5565.
- Orenbuch, A., Shalev, L., Marra, V., Sinai, I., Lavy, Y., Kahn, J., Burden, J. J., Staras, K. and Gitler, D. (2012) Synapsin selectively controls the mobility of resting pool vesicles at hippocampal terminals. *J Neurosci*, **32**, 3969-3980.
- Owe, S. G., Jensen, V., Evergren, E. *et al.* (2009) Synapsin- and actin-dependent frequency enhancement in mouse hippocampal mossy fiber synapses. *Cereb Cortex*, **19**, 511-523.
- Owen, D. J. (2004) Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation. *Biochem Soc Trans*, **32**, 1-14.
- Pan, P. Y., Marrs, J. and Ryan, T. A. (2015) Vesicular glutamate transporter 1 orchestrates recruitment of other synaptic vesicle cargo proteins during synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem*, **290**, 22593-22601.
- Park, H., Li, Y. and Tsien, R. W. (2012) Influence of synaptic vesicle position on release probability and exocytotic fusion mode. *Science*, **335**, 1362-1366.
- Park, J., Cho, O. Y., Kim, J. A. and Chang, S. (2016) Endosome-mediated endocytic mechanism replenishes the majority of synaptic vesicles at mature CNS synapses in an activity-dependent manner. *Sci Rep*, **6**, 31807.
- Patel, S. N., Rose, S. P. and Stewart, M. G. (1988) Training induced dendritic spine density changes are specifically related to memory formation processes in the chick, *Gallus domesticus*. *Brain Res*, **463**, 168-173.
- Pechstein, A. and Shupliakov, O. (2010) Taking a back seat: synaptic vesicle clustering in presynaptic terminals. *Front Synaptic Neurosci*, **2**, 143.
- Pereda, A. E. (2014) Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci*, **15**, 250-263.
- Perez Bay, A. E., Ibanez, L. I. and Marengo, F. D. (2007) Rapid recovery of releasable vesicles and formation of nonreleasable endosomes follow intense exocytosis in chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **293**, C1509-1522.
- Perin, M. S., Brose, N., Jahn, R. and Sudhof, T. C. (1991) Domain structure of synaptotagmin (p65). *J Biol Chem*, **266**, 623-629.
- Peters, A. and Connor, J. R. (1983) Bipolar Cells in Rat Visual-Cortex. *Anatomical Record*, **205**, A153-A153.
- Phillips, G. R., Huang, J. K., Wang, Y. *et al.* (2001) The presynaptic particle web: ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitution. *Neuron*, **32**, 63-77.
- Polo-Parada, L., Bose, C. M. and Landmesser, L. T. (2001) Alterations in transmission, vesicle dynamics, and transmitter release machinery at NCAM-deficient neuromuscular junctions. *Neuron*, **32**, 815-828.
- Pop, A. S., Gomez-Mancilla, B., Neri, G., Willemsen, R. and Gasparini, F. (2014) Fragile X syndrome: a preclinical review on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists and drug development. *Psychopharmacology (Berl)*, **231**, 1217-1226.
- Pyronneau, A., He, Q., Hwang, J. Y., Porch, M., Contractor, A. and Zukin, R. S. (2017) Aberrant Rac1-cofilin signaling mediates defects in dendritic spines, synaptic function, and sensory perception in fragile X syndrome. *Sci Signal*, **10**.
- Raimondi, A., Ferguson, S. M., Lou, X. *et al.* (2011) Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron*, **70**, 1100-1114.
- Raingo, J., Khvotchev, M., Liu, P. *et al.* (2012) VAMP4 directs synaptic vesicles to a pool that selectively maintains asynchronous neurotransmission. *Nat Neurosci*, **15**, 738-745.
- Ramirez-Franco, J., Alonso, B., Bartolome-Martin, D., Sanchez-Prieto, J. and Torres, M. (2013) Studying synaptic efficiency by post-hoc immunolabelling. *BMC Neurosci*, **14**, 127.

## Bibliografía

- Ramirez-Franco, J., Bartolome-Martin, D., Alonso, B., Torres, M. and Sanchez-Prieto, J. (2014) Cannabinoid type 1 receptors transiently silence glutamatergic nerve terminals of cultured cerebellar granule cells. *PLoS One*, **9**, e88594.
- Ramón y Cajal, S. (1893) Neue Darstellung vom histologischen Bau des Centralnervensystem. *Arch Anat Physiol*, 319-418.
- Ramón y Cajal, S. (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*, **2**.
- Ramperez, A., Sanchez-Prieto, J. and Torres, M. (2017) Brefeldin A sensitive mechanisms contribute to endocytotic membrane retrieval and vesicle recycling in cerebellar granule cells. *J Neurochem*, **141**, 662-675.
- Ratnayaka, A., Marra, V., Bush, D., Burden, J. J., Branco, T. and Staras, K. (2012) Recruitment of resting vesicles into recycling pools supports NMDA receptor-dependent synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *J Physiol*, **590**, 1585-1597.
- Rausch, G. and Scheich, H. (1982) Dendritic spine loss and enlargement during maturation of the speech control system in the mynah bird (*Gracula religiosa*). *Neurosci Lett*, **29**, 129-133.
- Renden, R. and von Gersdorff, H. (2007) Synaptic vesicle endocytosis at a CNS nerve terminal: faster kinetics at physiological temperatures and increased endocytotic capacity during maturation. *J Neurophysiol*, **98**, 3349-3359.
- Rex, C. S., Chen, L. Y., Sharma, A., Liu, J., Babayan, A. H., Gall, C. M. and Lynch, G. (2009) Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation. *J Cell Biol*, **186**, 85-97.
- Rey, S. A., Smith, C. A., Fowler, M. W., Crawford, F., Burden, J. J. and Staras, K. (2015) Ultrastructural and functional fate of recycled vesicles in hippocampal synapses. *Nat Commun*, **6**, 8043.
- Richards, D. A., Bai, J. and Chapman, E. R. (2005) Two modes of exocytosis at hippocampal synapses revealed by rate of FM1-43 efflux from individual vesicles. *J Cell Biol*, **168**, 929-939.
- Richards, D. A., Guatimosim, C. and Betz, W. J. (2000) Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron*, **27**, 551-559.
- Richards, D. A., Guatimosim, C., Rizzoli, S. O. and Betz, W. J. (2003) Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron*, **39**, 529-541.
- Richards, D. A., Rizzoli, S. O. and Betz, W. J. (2004) Effects of wortmannin and latrunculin A on slow endocytosis at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, **557**, 77-91.
- Rizzoli, S. O. and Betz, W. J. (2004) The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science*, **303**, 2037-2039.
- Rizzoli, S. O. and Betz, W. J. (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 57-69.
- Rosenmund, C. and Stevens, C. F. (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, **16**, 1197-1207.
- Rui, M., Qian, J., Liu, L., Cai, Y., Lv, H., Han, J., Jia, Z. and Xie, W. (2017) The neuronal protein Neurexin directly interacts with the Scribble-Pix complex to stimulate F-actin assembly for synaptic vesicle clustering. *J Biol Chem*, **292**, 14334-14348.
- Ruiz-Marcos, A. and Valverde, F. (1970) Dynamic architecture of the visual cortex. *Brain Res*, **19**, 25-39.
- Rust, M. B. and Maritzen, T. (2015) Relevance of presynaptic actin dynamics for synapse function and mouse behavior. *Exp Cell Res*, **335**, 165-171.
- Ryan, T. A., Reuter, H., Wendland, B., Schweizer, F. E., Tsien, R. W. and Smith, S. J. (1993) The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons. *Neuron*, **11**, 713-724.
- Ryan, T. A. and Smith, S. J. (1995) Vesicle pool mobilization during action potential firing at hippocampal synapses. *Neuron*, **14**, 983-989.
- Sabatini, B. L. and Regehr, W. G. (1996) Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. *Nature*, **384**, 170-172.

## Bibliografía

- Saheki, Y. and De Camilli, P. (2012) Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a005645.
- Sakaba, T. and Neher, E. (2003) Involvement of actin polymerization in vesicle recruitment at the calyx of Held synapse. *J Neurosci*, **23**, 837-846.
- Sankaranarayanan, S., Atluri, P. P. and Ryan, T. A. (2003) Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nat Neurosci*, **6**, 127-135.
- Sankaranarayanan, S. and Ryan, T. A. (2000) Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nat Cell Biol*, **2**, 197-204.
- Sankaranarayanan, S. and Ryan, T. A. (2001) Calcium accelerates endocytosis of vSNAREs at hippocampal synapses. *Nat Neurosci*, **4**, 129-136.
- Santoro, M. R., Bray, S. M. and Warren, S. T. (2012) Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. *Annu Rev Pathol*, **7**, 219-245.
- Santos, M. S., Foss, S. M., Park, C. K. and Voglmaier, S. M. (2014) Protein interactions of the vesicular glutamate transporter VGLUT1. *PLoS One*, **9**, e109824.
- Sara, Y., Virmani, T., Deak, F., Liu, X. and Kavalali, E. T. (2005) An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. *Neuron*, **45**, 563-573.
- Saviane, C. and Silver, R. A. (2006) Fast vesicle reloading and a large pool sustain high bandwidth transmission at a central synapse. *Nature*, **439**, 983-987.
- Schafer, D. A. (2004) Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic*, **5**, 463-469.
- Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C. and Mandel, J. L. (2001) A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8844-8849.
- Schikorski, T. (2014) Readily releasable vesicles recycle at the active zone of hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 5415-5420.
- Schikorski, T. and Stevens, C. F. (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci*, **17**, 5858-5867.
- Schikorski, T. and Stevens, C. F. (2001) Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat Neurosci*, **4**, 391-395.
- Shen, J., Tareste, D. C., Paumet, F., Rothman, J. E. and Melia, T. J. (2007) Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. *Cell*, **128**, 183-195.
- Shetty, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., Puchkov, D., Haucke, V. and Schachner, M. (2013) The neural cell adhesion molecule promotes maturation of the presynaptic endocytotic machinery by switching synaptic vesicle recycling from adaptor protein 3 (AP-3)- to AP-2-dependent mechanisms. *J Neurosci*, **33**, 16828-16845.
- Shi, G., Faundez, V., Roos, J., Dell'Angelica, E. C. and Kelly, R. B. (1998) Neuroendocrine synaptic vesicles are formed in vitro by both clathrin-dependent and clathrin-independent pathways. *J Cell Biol*, **143**, 947-955.
- Shulman, Y., Stavsky, A., Fedorova, T., Mikulincer, D., Atias, M., Radinsky, I., Kahn, J., Slutsky, I. and Gitler, D. (2015) ATP binding to synapsin IIa regulates usage and clustering of vesicles in terminals of hippocampal neurons. *J Neurosci*, **35**, 985-998.
- Shupliakov, O. (2009) The synaptic vesicle cluster: a source of endocytic proteins during neurotransmitter release. *Neuroscience*, **158**, 204-210.
- Shupliakov, O., Bloom, O., Gustafsson, J. S., Kjaerulff, O., Low, P., Tomilin, N., Pieribone, V. A., Greengard, P. and Brodin, L. (2002) Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14476-14481.
- Shupliakov, O. and Brodin, L. (2010) Recent insights into the building and cycling of synaptic vesicles. *Exp Cell Res*, **316**, 1344-1350.
- Shupliakov, O., Haucke, V. and Pechstein, A. (2011) How synapsin I may cluster synaptic vesicles. *Semin Cell Dev Biol*, **22**, 393-399.

## Bibliografía

- Siksou, L., Silm, K., Biesemann, C., Nehring, R. B., Wojcik, S. M., Triller, A., El Mestikawy, S., Marty, S. and Herzog, E. (2013) A role for vesicular glutamate transporter 1 in synaptic vesicle clustering and mobility. *Eur J Neurosci*, **37**, 1631-1642.
- Somogyi, P. (1977) A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res*, **136**, 345-350.
- Somogyi, P. and Cowey, A. (1981) Combined Golgi and electron microscopic study on the synapses formed by double bouquet cells in the visual cortex of the cat and monkey. *J Comp Neurol*, **195**, 547-566.
- Somogyi, P., Cowey, A., Halasz, N. and Freund, T. F. (1981) Vertical organization of neurones accumulating 3H-GABA in visual cortex of rhesus monkey. *Nature*, **294**, 761-763.
- Soykan, T., Kaempf, N., Sakaba, T., Vollweiter, D., Goerdeler, F., Puchkov, D., Kononenko, N. L. and Haucke, V. (2017) Synaptic Vesicle Endocytosis Occurs on Multiple Timescales and Is Mediated by Formin-Dependent Actin Assembly. *Neuron*, **93**, 854-866 e854.
- Sternberg, S. R. (1983) Biomedical Image-Processing. *Computer*, **16**, 22-34.
- Stoppel, L. J., Auerbach, B. D., Senter, R. K., Preza, A. R., Lefkowitz, R. J. and Bear, M. F. (2017) beta-Arrestin2 Couples Metabotropic Glutamate Receptor 5 to Neuronal Protein Synthesis and Is a Potential Target to Treat Fragile X. *Cell Rep*, **18**, 2807-2814.
- Straiker, A., Min, K. T. and Mackie, K. (2013) Fmr1 deletion enhances and ultimately desensitizes CB(1) signaling in autaptic hippocampal neurons. *Neurobiol Dis*, **56**, 1-5.
- Sudhof, T. C. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, **375**, 645-653.
- Sudhof, T. C. (2000) The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron*, **28**, 317-320.
- Sudhof, T. C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, **27**, 509-547.
- Sudhof, T. C. (2008) Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, **455**, 903-911.
- Sudhof, T. C. (2012a) Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a011353.
- Sudhof, T. C. (2012b) The presynaptic active zone. *Neuron*, **75**, 11-25.
- Sudhof, T. C. (2013) Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, **80**, 675-690.
- Sudhof, T. C. and Rizo, J. (2011) Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A. T. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, **395**, 347-353.
- Suvrathan, A., Hoeffler, C. A., Wong, H., Klann, E. and Chattarji, S. (2010) Characterization and reversal of synaptic defects in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 11591-11596.
- Szentagothai, J. and Arbib, M. A. (1974) Conceptual models of neural organization. *Neurosci Res Program Bull*, **12**, 305-510.
- Tabet, R., Vitale, N. and Moine, H. (2016) Fragile X syndrome: Are signaling lipids the missing culprits? *Biochimie*, **130**, 188-194.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K. et al. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, **127**, 831-846.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C. and Jahn, R. (2001) Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci*, **21**, RC182.
- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. and De Camilli, P. (1996) The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol*, **133**, 1237-1250.
- Taoufiq, Z., Eguchi, K. and Takahashi, T. (2013) Rho-kinase accelerates synaptic vesicle endocytosis by linking cyclic GMP-dependent protein kinase activity to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate synthesis. *J Neurosci*, **33**, 12099-12104.
- Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O. and Takeichi, M. (2002) Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*, **35**, 77-89.

## Bibliografía

- tom Dieck, S., Sanmarti-Vila, L., Langnaese, K. et al. (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol*, **142**, 499-509.
- Trommershauser, J., Schneggenburger, R., Zippelius, A. and Neher, E. (2003) Heterogeneous presynaptic release probabilities: functional relevance for short-term plasticity. *Biophys J*, **84**, 1563-1579.
- Uchida, N., Honjo, Y., Johnson, K. R., Wheelock, M. J. and Takeichi, M. (1996) The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol*, **135**, 767-779.
- Valtorta, F., Tarelli, F. T., Campanati, L., Villa, A. and Greengard, P. (1989) Synaptophysin and synapsin I as tools for the study of the exo-endocytotic cycle. *Cell Biol Int Rep*, **13**, 1023-1038.
- Valverde, F. (1976) Aspects of cortical organization related to the geometry of neurons with intra-cortical axons. *J Neurocytol*, **5**, 509-529.
- Valverde, F. (2002) [Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex]. *Rev Neurol*, **34**, 758-780.
- van Kan, P. L., Gibson, A. R. and Houk, J. C. (1993) Movement-related inputs to intermediate cerebellum of the monkey. *J Neurophysiol*, **69**, 74-94.
- van Stegen, B., Dagar, S. and Gottmann, K. (2017) Release activity-dependent control of vesicle endocytosis by the synaptic adhesion molecule N-cadherin. *Sci Rep*, **7**, 40865.
- Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Sudhof, T. C. and Brose, N. (2006) Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron*, **51**, 741-754.
- Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S. et al. (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, **65**, 905-914.
- Verstegen, A. M., Tagliatti, E., Lignani, G. et al. (2014) Phosphorylation of synapsin I by cyclin-dependent kinase-5 sets the ratio between the resting and recycling pools of synaptic vesicles at hippocampal synapses. *J Neurosci*, **34**, 7266-7280.
- Voglmaier, S. M., Kam, K., Yang, H., Fortin, D. L., Hua, Z., Nicoll, R. A. and Edwards, R. H. (2006) Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron*, **51**, 71-84.
- Wagh, D., Terry-Lorenzo, R., Waites, C. L., Leal-Ortiz, S. A., Maas, C., Reimer, R. J. and Garner, C. C. (2015) Piccolo Directs Activity Dependent F-Actin Assembly from Presynaptic Active Zones via Daam1. *PLoS One*, **10**, e0120093.
- Waites, C. L., Leal-Ortiz, S. A., Andlauer, T. F., Sigrist, S. J. and Garner, C. C. (2011) Piccolo regulates the dynamic assembly of presynaptic F-actin. *J Neurosci*, **31**, 14250-14263.
- Wang, H. (2016) Endocannabinoid Mediates Excitatory Synaptic Function of beta-Neurexins. Commentary: beta-Neurexins Control Neural Circuits by Regulating Synaptic Endocannabinoid Signaling. *Front Neurosci*, **10**, 203.
- Wang, X., Kibschull, M., Laue, M. M., Lichte, B., Petrasch-Parwez, E. and Kilimann, M. W. (1999) Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin. *J Cell Biol*, **147**, 151-162.
- Wang, X. H., Zheng, J. Q. and Poo, M. M. (1996) Effects of cytochalasin treatment on short-term synaptic plasticity at developing neuromuscular junctions in frogs. *J Physiol*, **491** (Pt 1), 187-195.
- Watanabe, S., Liu, Q., Davis, M. W., Hollopeter, G., Thomas, N., Jorgensen, N. B. and Jorgensen, E. M. (2013a) Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *Elife*, **2**, e00723.
- Watanabe, S., Rost, B. R., Camacho-Perez, M., Davis, M. W., Sohl-Kielczynski, B., Rosenmund, C. and Jorgensen, E. M. (2013b) Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*, **504**, 242-247.

## Bibliografía

- Watanabe, S., Trimbuch, T., Camacho-Perez, M. et al. (2014) Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature*, **515**, 228-233.
- Welzel, O., Henkel, A. W., Stroebel, A. M., Jung, J., Tischbirek, C. H., Ebert, K., Kornhuber, J., Rizzoli, S. O. and Groemer, T. W. (2011) Systematic heterogeneity of fractional vesicle pool sizes and release rates of hippocampal synapses. *Biophys J*, **100**, 593-601.
- Wen, P. J., Grenklo, S., Arpino, G. et al. (2016) Actin dynamics provides membrane tension to merge fusing vesicles into the plasma membrane. *Nat Commun*, **7**, 12604.
- Westphal, V., Rizzoli, S. O., Lauterbach, M. A., Kamin, D., Jahn, R. and Hell, S. W. (2008) Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science*, **320**, 246-249.
- White, E. L. and Czeiger, D. (1991) Synapses made by axons of callosal projection neurons in mouse somatosensory cortex: emphasis on intrinsic connections. *J Comp Neurol*, **303**, 233-244.
- White, E. L. and DeAmicis, R. A. (1977) Afferent and efferent projections of the region in mouse SmL cortex which contains the posteromedial barrel subfield. *J Comp Neurol*, **175**, 455-482.
- Winder, S. J. (2003) Structural insights into actin-binding, branching and bundling proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 14-22.
- Wolf, M., Zimmermann, A. M., Gorlich, A., Gurniak, C. B., Sassoe-Pognetto, M., Friauf, E., Witke, W. and Rust, M. B. (2015) ADF/Cofilin Controls Synaptic Actin Dynamics and Regulates Synaptic Vesicle Mobilization and Exocytosis. *Cereb Cortex*, **25**, 2863-2875.
- Wragg, R. T., Snead, D., Dong, Y., Ramlall, T. F., Menon, I., Bai, J., Eliezer, D. and Dittman, J. S. (2013) Synaptic vesicles position complexin to block spontaneous fusion. *Neuron*, **77**, 323-334.
- Wu, W. and Wu, L. G. (2007) Rapid bulk endocytosis and its kinetics of fission pore closure at a central synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10234-10239.
- Wu, X. S., Lee, S. H., Sheng, J. et al. (2016) Actin Is Crucial for All Kinetically Distinguishable Forms of Endocytosis at Synapses. *Neuron*, **92**, 1020-1035.
- Wu, X. S. and Wu, L. G. (2014) The yin and yang of calcium effects on synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci*, **34**, 2652-2659.
- Wyrofsky, R., McGonigle, P. and Van Bockstaele, E. J. (2015) Drug discovery strategies that focus on the endocannabinoid signaling system in psychiatric disease. *Expert Opin Drug Discov*, **10**, 17-36.
- Xu, H., Yang, Y., Tang, X. et al. (2013) Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. *Mol Neurobiol*, **47**, 833-844.
- Yang, X., Kaeser-Woo, Y. J., Pang, Z. P., Xu, W. and Sudhof, T. C. (2010) Complexin clamps asynchronous release by blocking a secondary Ca(2+) sensor via its accessory alpha helix. *Neuron*, **68**, 907-920.
- Yepes, M., Wu, F., Torre, E., Cuellar-Giraldo, D., Jia, D. and Cheng, L. (2016) Tissue-type plasminogen activator induces synaptic vesicle endocytosis in cerebral cortical neurons. *Neuroscience*, **319**, 69-78.
- Zakharenko, S., Chang, S., O'Donoghue, M. and Popov, S. V. (1999) Neurotransmitter secretion along growing nerve processes: comparison with synaptic vesicle exocytosis. *J Cell Biol*, **144**, 507-518.
- Zala, D., Hinckelmann, M. V., Yu, H., Lyra da Cunha, M. M., Liot, G., Cordelieres, F. P., Marco, S. and Saudou, F. (2013) Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell*, **152**, 479-491.
- Zhang, J., Hou, L., Klann, E. and Nelson, D. L. (2009) Altered hippocampal synaptic plasticity in the FMR1 gene family knockout mouse models. *J Neurophysiol*, **101**, 2572-2580.
- Zhang, W. D. and Benson, D. L. (2001) Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *Journal of Neuroscience*, **21**, 5169-5181.

## Bibliografía

- Zhao, H., Kim, Y., Park, J., Park, D., Lee, S. E., Chang, I. and Chang, S. (2014) SCAMP5 plays a critical role in synaptic vesicle endocytosis during high neuronal activity. *J Neurosci*, **34**, 10085-10095.
- Zhao, Y., Yin, L., Zhang, H., Lan, T., Li, S. and Ma, P. (2018) Eph/ephrin Family Anchored on Exosome Facilitate Communications between Cells. *Cell Biol Int*.
- Zimmermann, D., Santos, A., Kovar, D. R. and Rock, R. S. (2015) Actin age orchestrates myosin-5 and myosin-6 run lengths. *Curr Biol*, **25**, 2057-2062.
- Zimmermann, H., Volkandt, W., Wittich, B. and Hausinger, A. (1993) Synaptic vesicle life cycle and synaptic turnover. *J Physiol Paris*, **87**, 159-170.

## **IX-ANEXOS**

Como documento anexo se adjuntan parte de los resultados presentados en este trabajo en formato de publicación en la revista *Journal of Neurochemistry* y *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*.



ORIGINAL  
ARTICLE

## Brefeldin A sensitive mechanisms contribute to endocytotic membrane retrieval and vesicle recycling in cerebellar granule cells

Alberto Rampérez,<sup>\*†</sup> José Sánchez-Prieto<sup>\*†</sup> and Magdalena Torres<sup>\*†</sup> <sup>\*</sup>*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain*<sup>†</sup>*Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain***Abstract**

The recycling of synaptic vesicle (SV) proteins and transmitter release occur at multiple sites along the axon. These processes are sensitive to inhibition of the small GTP binding protein ARF1, which regulates the adaptor protein 1 and 3 complex (AP-1/AP-3). As the axon matures, SV recycling becomes restricted to the presynaptic bouton, and its machinery undergoes a complex process of maturation. We used the styryl dye FM1-43 to highlight differences in the efficiency of membrane recycling at different sites in cerebellar granule cells cultured for 7 days *in vitro*. We used Brefeldin A (BFA) to inhibit AP-1/AP-3-mediated recycling and to test the contribution of this pathway to the heterogeneity of the responses when these cells are strongly stimulated. Combining imaging techniques and ultrastructural

analyses, we found a significant decrease in the density of functional boutons and an increase in the presence of endosome-like structures within the boutons of cells incubated with BFA prior to FM1-43 loading. Such effects were not observed when BFA was added 5 min after the end of the loading step, when endocytosis was almost fully completed. In this situation, vesicles were found closer to the active zone (AZ) in boutons exposed to BFA. Together, these data suggest that the AP-1/AP-3 pathway contributes to SV recycling, affecting different steps in all boutons but not equally, and thus being partly responsible for the heterogeneity of the different recycling efficiencies.

**Keywords:** AP3 complex, Brefeldin A, cerebellar granule cells, endocytosis, FM1-43, synaptic vesicular cycle.

*J. Neurochem.* (2017) **141**, 662–675.

**Cover Image for this issue:** doi: 10.1111/jnc.13801.

During the maturation of a neuron, transmitter release and the recycling of synaptic vesicle (SV) proteins occurs at multiple sites along the axon (Antonov *et al.* 1999). These processes are sensitive to inhibition by the small GTP binding protein ARF1, which regulates the activity of the adaptor protein 1 and 3 complex (AP-1/AP-3) (Polo-Parada *et al.* 2001). As the axon matures, SV recycling becomes restricted to the presynaptic bouton and the machinery for SV recycling undergoes its own complex process of maturation, in some cases involving a switch in the adaptor proteins used (Bonanomi *et al.* 2006; Shetty *et al.* 2013). The brefeldin A (BFA)-sensitive adaptor protein AP-3 mediates clathrin-independent vesicle formation in immature SV recycling (Faundez *et al.* 1998; Shi *et al.* 1998), yet maturation can shift SV recycling from the plasma membrane to a pathway that primarily uses the AP-2 clathrin adaptor protein (Takei *et al.* 1996; Schmidt *et al.* 1997; Shi *et al.* 1998; Polo-Parada *et al.* 2001). Nevertheless, AP-1/AP-3-mediated

recycling still occurs in mature synapses, and while both the AP-2 and AP-1/AP-3 pathways may be employed, they might be activated under different circumstances in order to recycle distinct SV cargos or to generate vesicles from

Received November 7, 2016; revised manuscript received February 22, 2017; accepted March 1, 2017.

Address correspondence and reprint requests to Magdalena Torres, Departamento de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain. E-mail: mitorres@ucm.es

**Abbreviations used:** ADBE, activity-dependent bulk endocytosis; AP-1/AP-3, adaptor protein 1 and 3 complex; AP-2, adaptor protein 2 complex; AP3B2, AP-3 complex beta-2 subunit; ARF1, ADP-ribosylation factor 1; AZ, active zone; BFA, Brefeldin A; DIV, days *in vitro*; FM1-43, *N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino) styryl) pyridinium dibromide; P7, seven days postnatal; pCAGGs, CAG promoter is a strong synthetic promoter frequently used to drive high levels of gene expression in mammalian expression vectors; TEM, Transmission electron microscopy; vGluT1-pH, pH-sensitive GFP tagged to the luminal domain of the vesicular glutamate transporter 1.

# Nitric oxide and synaptic transmission in the cerebellum

Andrea Collado-Alsina<sup>1,2</sup>, Alberto Rampérez<sup>1,2</sup>, José Sánchez-Prieto<sup>1,2</sup> & Magdalena Torres<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid E28040, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC).

**Abstract.** Nitric oxide (NO) is a diffusible messenger that is almost universally found in the brain. For example, granule, stellate and basket cells express high levels of neuronal nitric oxide synthase, the synthetic enzyme for NO, in the cerebellum. NO can act as an intra- or intercellular messenger, and in both antero- and retrograde directions across synapses. The effects of NO are mainly mediated by the activation of soluble guanylyl cyclase (sGC), which catalyzes the production of cyclic guanosine-3',5'-monophosphate (cGMP) from GTP. Signal transduction downstream of cGMP, can involve cyclic nucleotide gated (CNG) cation channels, the activation of protein kinase G isoforms and protein phosphorylation or cyclic nucleotide hydrolyzing phosphodiesterases (PDEs). Since metabolism of cGMP by PDEs suppresses NO/sGC signaling, the equilibrium between cGMP synthesis and degradation will feedback onto NO signaling. In numerous studies, the NO/cGMP/cGK signaling cascade has been linked to the modulation of transmitter release, as well as synaptic excitability and plasticity. This review focuses on the role of NO and its downstream signaling (cGMP/cGK) as a regulator of synaptic transmission in the cerebellum, discussing the pre- and postsynaptic mechanisms regulated by NO/cGMP/cGK signaling.

## 1 Introduction

Nitric oxide (NO) is a ubiquitous messenger in the vascular, immune and nervous systems, in the latter acting as an inter- or intracellular messenger (Dawson and Snyder 1994; Garthwaite and Boulton 1995) and playing an active role in a variety of processes. Consequently, there are many reviews in the literature focusing on the role of NO in synaptic plasticity (Schuman and Madison 1994), neuronal development (Contestabile 2000), neurotoxicity and neuroprotection (Calabrese et al. 2007), retrograde signaling (Regehr et al. 2009), blood flow (Attwell et al. 2010) and synaptic transmission (Feil and Kleppisch 2008; Garthwaite 2008). At

physiologically relevant concentrations, NO displays little activity (Garthwaite 2016), except for its reactivity with other radicals and its high affinity for transition metals, especially iron (such as the heme group of guanylyl cyclase -GC: (Hill et al. 2010). Binding of NO to the sixth coordination position of ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in the heme group triggers the synthesis of cyclic guanosine-3',5'-monophosphate (cGMP) from GTP (Ma et al. 2007; Waldman and Murad 1987). However, in some cases NO signaling is cGMP independent, although this requires much higher concentrations of NO (Heinrich et al. 2013; Palmer et al. 2008).

This chapter aims to summarize our current understanding of the role of NO, initially called the endothelial-derived relaxing factor, in synaptic transmission in the cerebellum, a structure in the brain where elements of the NO signaling cascade (cGMP-dependent) are particularly strongly expressed (Bredt et al. 1990). First, the molecular components of the NO/cGMP signaling pathway and their expression in different cell types will be described. Then, the effects of NO/cGMP signaling on synaptic transmission will be summarized both in the pre and postsynaptic compartment.

## **2 The sources of NO and cGMP**

### **2.1 Nitric oxide synthases**

The first evidence that neurons produce a substance with similar properties to the endothelial-derived relaxing factor was obtained when cerebellar cultures were stimulated by excitatory amino acids (Garthwaite et al. 1988). Nitric oxide synthases (NOSs), the synthetic enzymes for NO, were initially described in 1989 (Bredt and Snyder 1989; Garthwaite et al. 1989), and their three major isoforms were cloned and purified between 1991 and 1994. NOSI or neuronal NOS (nNOS) from rat cerebellum was the first isoform characterized (Bredt et al. 1991), and it is predominantly found in nervous tissue. NOSII or inducible NOS (iNOS) is so named because while NOSI and NOSIII are constitutive, NOSII expression is induced by different cytokines in a wide range of tissues (Forstermann et al. 1994; Kleinert et al. 1998). Finally, NOSIII or endothelial NOS (eNOS) is found primarily in vascular endothelial cells.

Of the three NOS isoforms, the constitutive nNOS and eNOS isoforms are expressed abundantly in the cerebellum (Campese et al. 2007; Ihara et al. 2006). By contrast, iNOS is expressed weakly under normal conditions although its expres-

sion can increase in disease states (Rodrigo et al. 2001; Suarez et al. 2005). The most strongly expressed isoform is nNOS, found at higher levels than those detected in other areas of the brain (Su et al. 2010). At the neuronal level, this protein is expressed by mature granular neurons and interneurons in the molecular layer, as well as basket cells and stellate cells (Reiersen et al. 2011). Its expression increases as development proceeds (Ciani et al. 2006; Jurado et al. 2005; Wang et al. 1998) and it is regulated by NMDAR (N-methyl-D-aspartic acid receptor) activation (Virgili et al. 1998). The expression of nNOS also increases significantly when cultured granule cells begin to reach a state of functional maturity (Contestabile 2002; Jurado et al. 2004).

## 2.2 Soluble Guanylyl Cyclases

Soluble guanylyl cyclase (sGC) is the most sensitive receptor for NO, and it catalyzes the conversion of GTP to cGMP (Waldman and Murad 1987). This sGC is a heterodimeric hemoprotein composed of an  $\alpha$  and  $\beta$  subunit, and the expression of the two subunits is required for catalytic activity (Budworth et al. 1999; Harteneck et al. 1991). There are two isoforms of each  $\alpha$  and  $\beta$  subunit that constitute the active sGC,  $\alpha 1$  or  $\alpha 2$  and  $\beta 1$  or  $\beta 2$  (Derbyshire and Marletta 2012; Russwurm and Koesling 2004; Zabel et al. 2002). The  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  isoforms form active heterodimers with  $\beta 1$ , with identical kinetic and pharmacological properties (Russwurm et al. 2001; Wykes and Garthwaite 2004), whereas the role of the putative  $\beta 2$  subunit remains unclear (Derbyshire and Marletta 2012). Both sGCs ( $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$ ) are particularly sensitive physiological targets for NO, with half-maximal activity observed in the low nM range of NO (Roy et al. 2008). Thus, they are likely to play a crucial role in the signaling cascade initiated by NO synthesis. Upon binding to the heme of sGC, NO promotes an increase in its enzymatic activity.

Two active sGC isoforms are expressed in the brain,  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$ , although they are not found equally in all regions and they are not expressed at constant levels throughout development (Gibb and Garthwaite 2001; Jurado et al. 2003; Jurado et al. 2004; Mergia et al. 2003). Their distribution may also differ at the sub-cellular level, not least because the C-terminal end of the  $\alpha 2$  subunit contains a sequence that can interact with PDZ domains (Russwurm et al. 2001). Thus, the  $\alpha 2\beta 1$  isoform may be associated with membranes due to the interaction of its PDZ domain with synaptic proteins like PSD95 (Russwurm et al. 2001). However,  $\alpha 1\beta 1$  may be cytosolic although it can associate with the plasma-membrane under certain conditions (Jones et al. 2008; Zabel et al. 2002). The expression of the  $\alpha 2$  subunit in the rat brain has been linked to brain development (Bidmon et al. 2004) and it is up-regulated by NMDAR activation during cerebellar granule cell matu-

ration in vitro (Jurado et al. 2003). While the  $\alpha 2$  subunit of sGCs may be permanently linked to membrane scaffold synaptic proteins (Bidmon et al. 2005),  $\beta 1$ -subunits, by contrast, may act as intracellular regulators that translocate and interact with the  $\alpha 2$  subunit upon synaptic activation. Such activity-dependent formation of functional heterodimers may favor the subcellular re-localization of cGMP that contributes to the well-established NO dependent rise in cGMP in response to synaptic stimulation (Hartell et al. 2001; van Staveren et al. 2004). In the cerebellum, sGC was initially localized in neuronal and astroglial structures by immunocytochemistry (Nakane et al. 1983; Zwiller et al. 1981), and studies using antibodies against cGMP showed intense labeling in granule, basket and stellate cells, as well as in astrocytes and Bergmann glia after stimulating cerebellar slices with NO donors (De Vente et al. 1990; Southam et al. 1992). The two isoforms,  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$ , are expressed in the cerebellum (Garthwaite 2005; Jurado et al. 2003; Wykes and Garthwaite 2004), and half of the activity in homogenates of the rat cerebellum is in the cytosol, with the other half in the membrane fraction (Wykes and Garthwaite 2004). The association of  $\alpha 2\beta 1$  isoforms to membrane bound synaptic proteins may take place near the sites of NO production (Garthwaite 2008), linking its activity to synaptic signaling pathways (Bidmon et al. 2006; Pifarre et al. 2007).

### 3 Downstream cGMP effectors

#### 3.1 Ion Channels

Cyclic nucleotide-regulated channels are mainly grouped into the cyclic nucleotide-gated (CNG) channels and the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels. CNG channels are activated by direct cyclic nucleotide binding and once open, they are cation-permeable and mainly allow the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  into the cell (Biel et al. 1999; Kaupp and Seifert 2002; Matulef and Zagotta 2003). Unlike neurotransmitter receptors, they do not become desensitized by continuous interaction with their ligands (Kaupp and Seifert 2002) and, due to their high permeability to  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  they may play an important role in neuronal physiology, affecting calcium dependent mechanisms. In recent years, the presence of cGMP sensitive channels has been described in the cerebellum and in particular in cerebellar granular neurons (Lopez-Jimenez et al. 2012).

Like CNG channels, HCN cation channels are members of the six transmembrane superfamily that open upon hyperpolarization and close at positive potentials (Biel et al. 2002; Kaupp and Seifert 2001; Robinson and Siegelbaum 2003),

generating an inward current that tends to stabilize the membrane potential in neurons (Frere et al. 2004). Thus, signal transduction through these HCN channels could help explain a number of direct or indirect (through cGMP) actions of NO that modify neuronal membrane potentials or excitability (Garthwaite 2008; Kopp-Scheinflug et al. 2015). In the cerebellum, the HCN1 subunit is expressed by neurons of the deep cerebellar nuclei (DCN) and basket cells (Garthwaite et al. 2006; Lujan et al. 2005).

### 3.2 Phosphodiesterases

Phosphodiesterases (PDEs) are a family of enzymes that catalyze the hydrolysis of cyclic nucleotides to their corresponding 5'-monophosphate nucleotides, thereby regulating the cellular concentrations of such cyclic nucleotides. In mammals, 11 PDE families have been identified, each differing in their substrate specificity, sensitivity to inhibitors, regulatory mechanisms and tissue distribution (Charbonneau et al. 1986). While families 1, 2, 3, 10 and 11 hydrolyze both cAMP and cGMP, families 5, 6 and 9 specifically hydrolyze cGMP, and among them type 9 PDEs are those that have the greatest affinity for cGMP (Bender and Beavo 2006).

However, the data regarding PDE expression in the cerebellum and its presence in specific cell types is somewhat contradictory. PDE1 activity was found in the cytosol of cerebellar granule cells and astrocytes (Agullo and Garcia 1997), and PDE1B is expressed in only a subset of Purkinje cells (PCs), suggesting that individual cells may differentially regulate cGMP depending on the PDE isozymes expressed (Shimizu-Albergine et al. 2003). Members of the PDE 5 family are expressed abundantly in cerebellar PCs (van Staveren et al. 2004). The most abundant family in the cerebellum and olfactory bulb are the type 9 PDEs (Andreeva et al. 2001), and their strong affinity for cGMP suggests they may be the PDEs involved in regulating the NO/cGMP pathway in the cerebellum. Indeed, using microdialysis to measure extracellular cGMP in the cerebellum of awake rats, PDE5/9 were confirmed to be the main cGMP hydrolyzing enzymes, although PDE1 and 4 also fulfil this role (Marte et al. 2008).

### 3.3 cGMP dependent protein kinases

The cGMP-dependent protein kinases (cGKs) are serine/threonine kinases of which two types have been identified: type I (cGKI), which include two isoforms (cGKI $\alpha$  and cGKI $\beta$ ) generated by alternative splicing of the same gene, located mainly in the cytosol; and type II (cGKII) anchored to the plasma membrane by myristoylation of the NH<sub>2</sub>-terminal Gly2 residue (Vaandrager et al. 1996; Vaandrager et al. 1998). The activity of these kinases is involved in a multitude of physiological processes, such as platelet aggregation, smooth muscle relaxation, intestinal water secretion, water and salt reabsorption in the distal tubule of the nephrons, and the integration of nerve signals (Hofmann et al. 1992; Hofmann et al. 2006).

Both, cGKI ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and cGKII have a regulatory site at their N-terminal, and a catalytic domain at the C-terminal. In addition to the two tandem cGMP-binding sites, the regulatory domain contains: an autophosphorylation site; an autoinhibitory site; a dimerization site; and an intracellular localization site that determines the interaction of the enzyme with specific subcellular structures (Lu et al. 1999). The latest consists of an alpha-helix with a conserved leucine/isoleucine heptad repeat, which also serves to bind interacting proteins in an isotype-specific manner (Casteel et al. 2005; Kato et al. 2012; Lee et al. 2007; Reger et al. 2014). Finally, the catalytic domain at the C-terminus of cGKs contains the binding sites for Mg<sup>2+</sup>, ATP and the target protein (Wang and Robinson 1997).

High concentrations of cGKI $\alpha$  are found in all smooth muscles, the cerebellum, dorsal root ganglia (DRG), neuromuscular junction end plates and kidney. In the cerebellum, cGKI $\alpha$  is mainly localized to PCs (El-Husseini et al. 1999; Lohmann et al. 1981), although granule neurons and astrocytes also express this enzyme (Boran and Garcia 2007; Jurado et al. 2004). Likewise, cGKI $\beta$  is also expressed strongly in smooth muscle, and platelets, hippocampal neurons and olfactory bulb neurons also mainly contain this isozyme (Geiselhoringer et al. 2004). Conversely, cGKII is expressed in several brain nuclei, and in the intestinal mucosa, kidney, adrenal cortex, chondrocytes and lung (Chikuda et al. 2004; de Vente et al. 2001). Indeed, cGKII is a very ubiquitous protein kinase in the brain, where it is found in the cerebral cortex, brainstem and cerebellum (de Vente et al. 2001). This protein is mainly expressed by neurons, but occasionally by oligodendrocytes and astrocytes, and it appears to be readily transported to nerve endings (de Vente et al. 2001).

Although cGKs are involved in physiological processes in the nervous system, there appear to be remarkably few known and contrasted cGKs substrates in the brain (Feil et al. 2005; Wang and Robinson 1997). Among the known substrates of these enzymes are: the IP3 receptor (Haug et al. 1999), G-substrate (Endo 2012), dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (DARP-32: (Nishi et al. 2005), phospholipase C (Xia et al. 2001) and vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), which regulate the actin cytoskeleton and vesicle trafficking (Butt et al. 1994; Jurado et al. 2004); G-septin, a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals (Xue et al. 2004); and the AMPA receptor subunit GluA1 (Incontro et al. 2013; Serulle et al. 2007).

## **4 NO and Synaptic transmission in the cerebellum**

### **4.1 Granule cells as a central player in cerebellar NO signaling**

Considering the cerebellar neurochemical circuit initially described by John Eccles (Eccles et al. 1967), granular neurons play a central role in cerebellar neurotransmission, participating in different kind of cerebellar excitatory synapses. Granule neurons receive inputs through the synapses that mossy fibers establish with them, and they stimulate PCs through the multiple contacts set by PF on their dendritic trees. Thus, the two more abundant synapses in the cerebellum (both glutamatergic) are those in which granule cells participate and they will serve to define the role of NO in cerebellar synaptic transmission. Considering the gaseous nature of NO and the expression of nNOS in granular neurons (Ciani et al. 2006; Contestabile 2002; Jurado et al. 2003), the anatomical organization of the cerebellar granule cell layer may have important consequences for NO function. Indeed, these two types of synapses exemplify how, besides acting as an intracellular messenger (Collado-Alsina et al. 2014; Incontro et al. 2013; Lopez-Jimenez et al. 2009), NO can be released from granule cells and act as a retrograde messenger at mossy fiber terminals (D'Angelo et al. 2001; Maffei et al. 2003), or as an anterograde messenger acting on PCs (Casado et al. 2002; Lev-Ram et al. 2002; Linden and Connor 1992; Shibuki and Kimura 1997; Shibuki and Okada 1991). Thus, granule cells appear to be central elements in cerebellar NO signaling and in the regulation of neurotransmission.

#### 4.1.1 Mossy fiber-granule cell synapses

Cerebellar mossy fibers form large glutamatergic terminals that synapse with numerous granule cells (D'Angelo et al. 1995; Eccles et al. 1967; Garthwaite and Brodbelt 1989). These synapses are structurally specialized to transmit information to many postsynaptic neurons. Moreover, since transmission is not strictly unidirectional and various signals of postsynaptic origin flow towards pre-synaptic targets, like NO (Mayer et al. 1992; Panda et al. 2001), the NO released by individual granule cells may participate in the regulation of the mossy fiber terminal (Fig.1), enhancing the current generated and neurotransmission (Maffei et al. 2003). In this sense, high-frequency mossy fiber stimulation causes significant NO release in the granular layer, with NO acting as a retrograde signal that enhances presynaptic terminal excitability by a cGMP-dependent mechanism (Maffei et al. 2003).

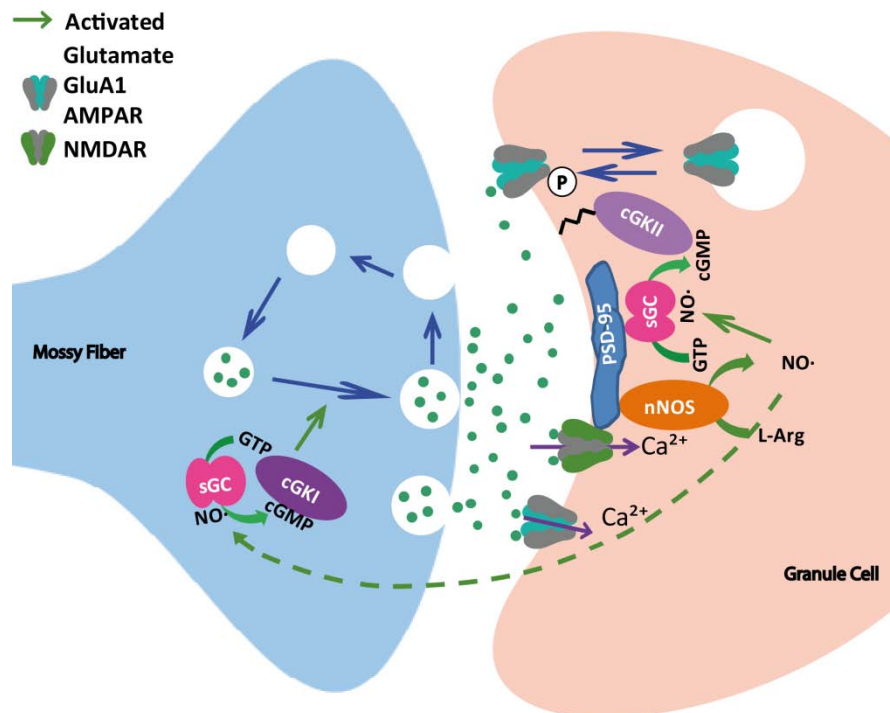


Fig. 1 Nitric oxide (NO) signaling at a mossy fiber (MF)-granule cell (GC) synapse. NO generated post-synaptically in the GC by a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-

dependent neuronal NO synthase (nNOS) can either activate a soluble guanylyl cyclase (sGC) in the same compartment or diffuse into the presynaptic terminal (as a retrograde messenger), activating sGC there. The resulting increase in intracellular cGMP activates various receptors, including the cGMP-dependent protein kinases (cGKs). At the presynapse, cGK phosphorylates different substrates, enhancing MF excitability and transmitter release. In addition, cGKII phosphorylates GluA1 subunits and promotes its incorporation into the postsynaptic plasma membrane, generating a  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA receptor.

NO produced by granular cells also triggers cGMP synthesis in the same cells, which in turn activates cGKs (Jurado et al. 2004). Stimulation of NMDARs activates cGKII, which leads to GluA1 phosphorylation at S845, favoring its insertion into the plasma membrane and the formation of functional calcium permeable receptors (Incontro et al. 2013). In the cerebellar fraction of the postsynaptic density from cGKII KO mice, there is an accumulation of less S845 pGluA1 and total GluA1 than in the same fraction from WT mice. Moreover, cGKII silencing effectively reduces the GluA1 in the plasma membrane of cerebellar granule cells. Since these two proteins co-immunoprecipitate, GluA1 and cGKII, they may well assemble into stable complexes in the cerebellum that allows activated cGKII to phosphorylate GluA1, thereby triggering its incorporation into the plasma membrane (Incontro et al. 2013). The existence of this complex and the enhancement of GluA1 membrane insertion by NMDA-NO-cGKII signaling has also been demonstrated in hippocampal and cortical neurons, where this mechanism appears to be relevant to LTP (Serulle et al. 2007). Although this mechanism has not been related to any type of plasticity in the cerebellum, it might help strengthen the mossy fiber-granule cells synapses, or the formation of new ones triggered by NO and cGMP. In this sense, in cerebellar granule cells in culture both 8-Br-cGMP (a cell permeable cGMP analogue) and NMDA increase the density of puncta immunoreactive for synapsin (presynaptic marker) and GluA1 clusters, effects that are counteracted and reversed by cGKII inhibition (Incontro et al. 2013; Lopez-Jimenez et al. 2012). The NO activated cGMP pathway fulfils an important role in coordinating the functional and structural pre- and postsynaptic alterations at these synapses in response to neuronal activity elsewhere (Ota et al. 2010; Wang et al. 2005).

#### **4.1.2 Parallel fiber (PF)–Purkinje cell synapses.**

Granule cells express nNOS, sGC, cyclic nucleotide operated channels and the two types of cGKs (Bredt et al. 1990; Contestabile 2002; Garthwaite and Boulton 1995; Jurado et al. 2003; Lopez-Jimenez et al. 2012). By contrast, PCs express

sGC (Ariano et al. 1982) and cGKI $\alpha$  (Lohmann et al. 1981), and only G substrate (a proposed cGK substrate) is found in these neurons (Schlichter et al. 1978; Schlichter et al. 1980). PCs receive their input from granule cells through thousands of PF *en passant* boutons (Palay and Chan-Palay 1974), these releasing glutamate in response to the arrival of an action potential (AP). Receptor activation in the postsynaptic neuron would provide continuity to the nerve impulse, which in this way would propagate throughout the neural network (Sudhof 2004; Sudhof and Rizo 2011). During high-frequency bursts, glutamate released by PF terminals can also bind to presynaptic NMDARs as a new depolarization pulse arrives (Casado et al. 2000; Casado et al. 2002). The coincidence of these two phenomena, glutamate binding and depolarization, is necessary for NMDARs activation. At resting membrane potentials, external magnesium ( $Mg^{2+}$ ) ions enter the NMDAR pore and blocking it, only a depolarization of sufficient amplitude and duration will remove the  $Mg^{2+}$  ions from the pore, thereby allowing  $Ca^{2+}$  influx and the activation of nNOS (Casado et al. 2002). The resulting NO may then act in the same presynaptic compartment, regulating transmission, or it could diffuse across the cell membrane to the postsynaptic compartment, and act as an anterograde messenger. At the presynapse, NO/cGMP/cGK regulates vesicular recycling (see below), whereas NO acts as a retrograde messenger in many other synapses to adapt the velocity of this cycle to the cells activity (Eguchi et al. 2012; Micheva et al. 2003). At the PF-PC synapse, NO acts as an intracellular messenger that is synthesized in response to the afferent burst (Fig. 2). In addition, NO released from other synapses or at sites other than PFs may contribute to the regulation of the presynaptic mechanisms at PF terminals through diffusion.

At postsynaptic terminals, NO generated by PF activity causes a long-term increase in the spontaneous firing rate of PCs (Smith and Otis 2003). This cGMP and cGK-dependent mechanism could configure long-term settings in the basal firing rate of endogenously active neurons in response to changes in afferent activity (Smith and Otis 2003). Moreover, cGK can phosphorylate different proteins in PCs, including AMPA receptors (Nakazawa et al. 1995), IP3 receptors (Haug et al. 1999) and G substrate (Endo et al. 1999), a 24 kDa protein specifically expressed by PCs (Detre et al. 1984). Phosphorylated G-substrate is an effective protein phosphatase (PP1 and PP2A) inhibitor and by inhibiting endogenous phosphatases, it might control different signal transduction pathways, including those activated by PKC, protein tyrosine kinases or MAPKs (Ito 2001), thereby affecting clathrin-mediated internalization of AMPA receptors (Wang and Linden 2000). This latter mechanism is responsible for the induction of long term depression (LTD), as confirmed in a PC-specific cGKI knockout mice (Feil et al. 2003).

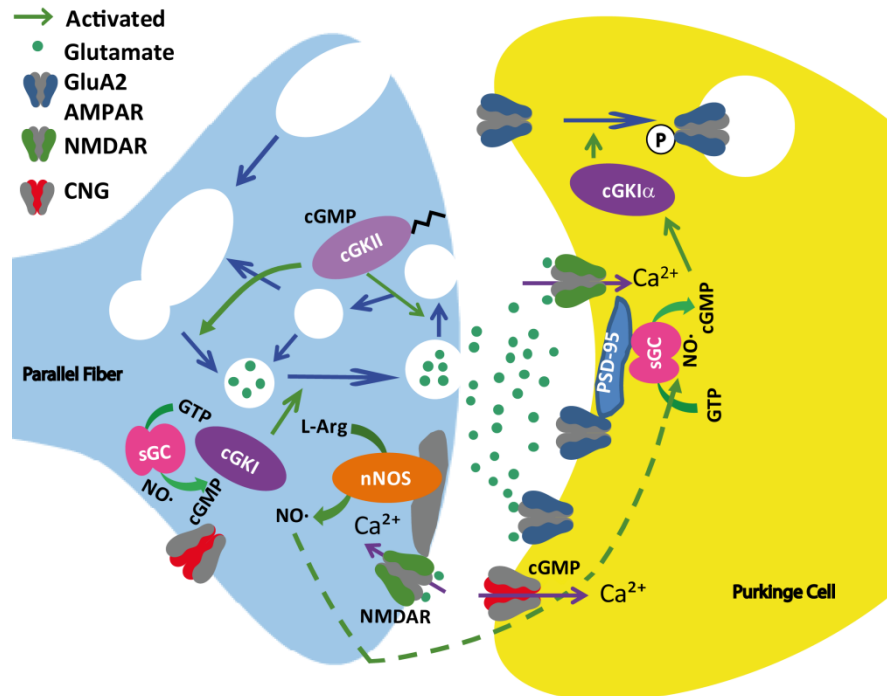


Fig.2 Nitric oxide (NO) signaling in a parallel fiber (PF)-Purkinje cell synapse. NO generated presynaptically in the GC by a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent neuronal NO synthase (nNOS) can either activate a soluble guanylyl cyclase (sGC) in the same compartment or diffuse to the postsynaptic terminal (as an anterograde messenger), activating sGC there. The resulting increase in intracellular cGMP activates various receptors, including the cGMP-dependent protein kinases (cGKs) or cyclic nucleotide channels (CNGs). At the presynapse, cGKs regulate vesicle recycling and transmitter release. In Purkinje cells, cGKIα increases the spontaneous firing rate. The phosphorylation of G substrate inhibits protein phosphatases 1 and 2A (PP1 and PP2A), enhancing the phosphorylation of the GluA2 subunit and promoting its endocytosis. In addition, cGMP may activate CNGs on both sides of the synapse, modulating the membrane potential and the Ca<sup>2+</sup> concentration.

### **4.1.3 Vesicle recycling as a target of NO/cGMP/cGK signaling to regulate synaptic transmission**

In general terms, the onset of synaptic transmission could be defined chronologically as follows. The arrival of an AP to the presynaptic terminal generates a transient elevation in the calcium concentration in the active zone (AZ) due to the opening of voltage-dependent calcium channels. This rise in calcium triggers the calcium-dependent fusion of synaptic vesicles (SVs) that contain the neurotransmitter and consequently, the release of neurotransmitter into the synaptic cleft. After exocytosis, SVs are endocytosed and recycled to maintain synaptic transmission (Shupliakov and Brodin 2010; Sudhof 2004). Recycling limits synaptic efficacy, a fact that became apparent in *Drosophila* Shibire mutants (Chen et al. 1991; Koenig and Ikeda 1989). When a synaptic terminal receives a train of high frequency APs, vesicular recycling is the step that critically limits the availability of SVs and hence, the fidelity of synaptic transmission (Dittman and Ryan 2009; Shupliakov and Brodin 2010; Sudhof 2004; von Gersdorff 2001). Such recycling can be regulated by different signaling molecules, including the NO that is synthesized in the same presynaptic terminal (Collado-Alsina et al. 2014; Lopez-Jimenez et al. 2009) or in the postsynaptic terminal (Eguchi et al. 2012; Micheva et al. 2003; Taoufiq et al. 2013).

In the last two decades, different fluorescence imaging methods have been developed to study SV fusion, endocytosis and recycling in living cells (Kavalali and Jorgensen 2014). This process was characterized by electron microscopy in the 1980s, although it is a technique that lacks the ability to follow living cells. These imaging methods take advantage of the uptake of fluorescent probes into recycling vesicles (e.g. FM1-43 dye: Fig.3A and B) or the exogenous expression of SV membrane proteins tagged with a pH-sensitive fluorescent marker in their lumen domain (e.g., vGluT1-pH: Fig. 3C and D). When the FM1-43 dye is used to track SV recycling, based on its binding to the lumen leaflet of exocytosed SVs and on its unloading after subsequent stimulation, recycling pathways that less efficiently deliver fusion competent vesicles result in less dye loss (Bartolome-Martin et al. 2012).

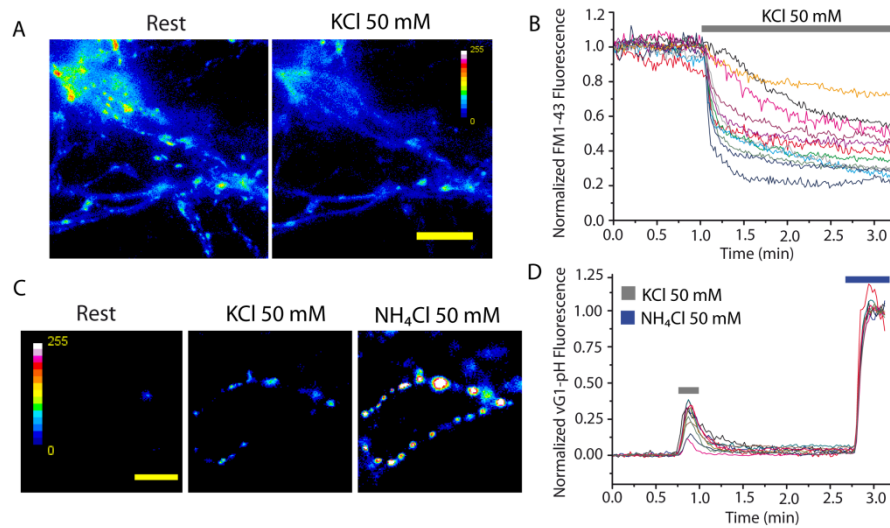


Fig. 3. Live imaging of synaptic vesicle cycling. A) Pseudocolor images of FM1-43 fluorescence from a 7 DIV granule cell field before stimulation (left panel) and after a 3 min stimulation with 50 mM KCl (right panel). B) Representative unloading kinetics of individual FM1-43 stained boutons normalized to the initial fluorescence. C) Fluorescence images of vGluT1-pHluorin transfected granule cells at rest (left panel), upon stimulation for 10 s with KCl (50 mM, middle panel) and after alkalization with NH<sub>4</sub>Cl (right panel) to reveal the total vesicle pool. The pseudocolor scale indicates the relative fluorescence intensity. D) Individual kinetics of vGluT1-pHluorin transfected boutons indicating the onset of stimulation and the NH<sub>4</sub>Cl alkalization step.

Imaging techniques can be combined with electron microscopy to study the vesicular cycle, for example using the fluorescent endocytotic marker FM1-43<sub>FX</sub> to label the vesicles that undergo recycling upon stimulation (Fig. 4).

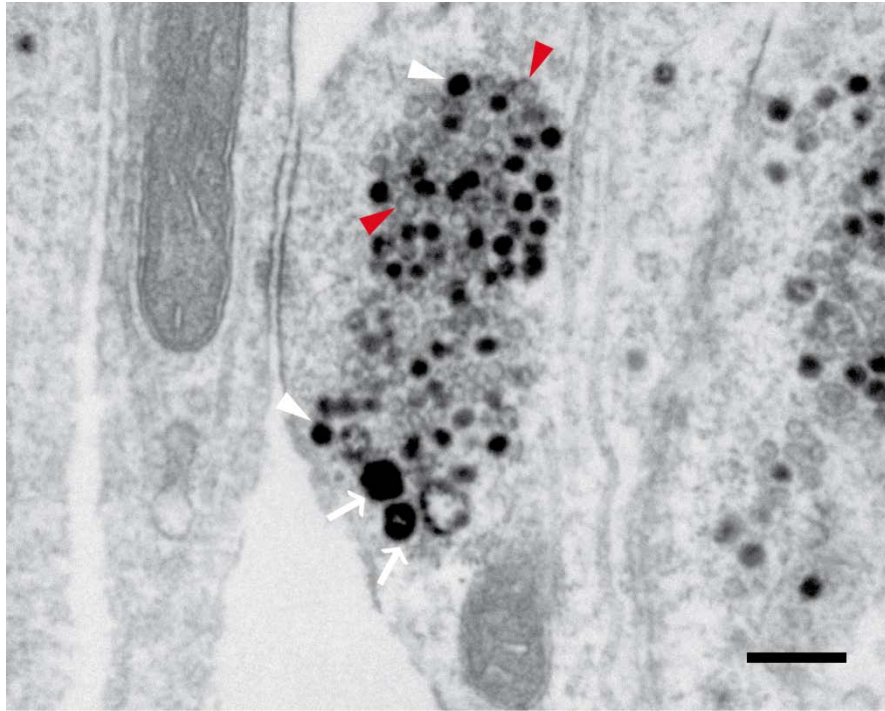


Fig. 4. Electron microscopy image of a photoconverted synapse. Micrograph showing a granule cell "en passant" bouton labeled with FM1-43<sub>FX</sub> photoconversion. White arrowheads point to the photoconverted vesicles with a dark lumen (PC<sup>+</sup>), while red arrowheads indicate non-photoconverted vesicles (PC<sup>-</sup>) and white arrows PC<sup>+</sup> endosomes. Scale bar 200 nm.

A regulatory mechanism of vesicle recycling based on NMDAR activation, cGMP synthesis and cGKII activation has been demonstrated in rat cerebellar granule cells through different experimental approaches (Collado-Alsina et al. 2017; Collado-Alsina et al. 2014; Lopez-Jimenez et al. 2009). Using FM1-43 to track SV recycling, blockage of the NMDAR slows SV recycling at a subset of synaptic boutons during strong and sustained stimulation, an effect that is prevented by pharmacologically increasing cGMP and that is mimicked by inhibiting sGC (Collado-Alsina et al. 2014; Lopez-Jimenez et al. 2009). Similar effects on SV recycling are produced by a cGK inhibitor or when the expression of cGKII is si-

lenced, suggesting that the activation of this kinase accelerates vesicular cycling, which is important for efficient endocytosis during strong and sustained stimulation (Collado-Alsina et al. 2014).

The dependence on cGKII for efficient membrane retrieval after strong stimulation has been confirmed in cerebellar granule cells from cGKII<sup>-/-</sup> mice (Collado-Alsina et al. 2017). In these cells, the two cGKs seem to exert opposite effects on vesicle release and whereas the lack of cGKII enhances exocytosis, the inhibition of cGKI impairs exocytosis of the whole population of boutons (Collado-Alsina et al. 2017). This mechanism is triggered by NO synthesized presynaptically in response to an afferent burst, although it can also be synthesized in response to a retrograde messenger. The cannabinoids released by PCs represent one such messenger, which activate CB1Rs at PF terminals and promote NO production (Wang et al. 2014). Similar mechanisms have been shown at hippocampal synapses in culture, although with NO acting as a retrograde messenger (Micheva et al. 2003), as well as at calyx of Held synapses in rodent brainstem slices (Eguchi et al. 2012; Taoufiq et al. 2013). In these synapses, retrograde activation of cGK by the NO released from the postsynaptic compartment accelerates vesicle endocytosis, strengthening exoendocytic coupling after high frequency stimulation (HFS; Eguchi et al. 2012; Taoufiq et al. 2013).

Regarding the molecular mechanism involved, NO/cGMP/cGK is thought to promote an increase in the concentration of presynaptic phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) due to the activation of PIP5K (Micheva et al. 2001). However, PI(4,5)P<sub>2</sub> could also increase as a consequence of the inhibition of phospholipase C-β<sub>3</sub> (Xia et al. 2001). The increase in PI(4,5)P<sub>2</sub> accelerates endocytosis and vesicular recycling in general (Cremona and De Camilli 2001), promoting clathrin-coated vesicle formation (Slepnev and De Camilli 2000). Thus, the formation of PI(4,5)P<sub>2</sub> in response to NO synthesis favors clathrin-mediated endocytosis (CME) after HFS (Eguchi et al. 2012; Micheva et al. 2003), although during intense stimulation, activity-dependent bulk endocytosis (ADBE) becomes the dominant mode of membrane retrieval (Clayton et al. 2008; Cheung and Cousin 2012; Dittman and Ryan 2009). ADBE is a mode of membrane recovery activated by HFS, where a large number of vesicles fuse with the plasma membrane, generating large endocytotic intermediaries (Bartolome-Martin et al. 2012; Clayton et al. 2007; Clayton et al. 2008; Clayton et al. 2010; Heuser and Reese 1973; Wenzel et al. 2012; Wu and Wu 2007; Wu et al. 2009). This type of endocytosis is not involved in the immediate re-availability of vesicles but rather, in preventing a deleterious increase at the membrane of the presynaptic terminal (Clayton and Cousin 2009), and the final destination of the endosomes formed seems to be their future budding to yield new vesicles (Clayton and Cousin 2009; Clayton et al.

2008; Ramperez et al. 2017; Teng et al. 2007). The models used to explain this type of endocytosis assume a saturation of clathrin-mediated endocytosis (Lou et al. 2008) and once this capacity is exceeded, bulk endocytosis will be triggered (Clayton and Cousin 2009). Since these two forms of endocytosis co-exist in the same synaptic terminal, their equilibrium can regulate the rate and extent of SV recycling (Bartolome-Martin et al. 2012; Voglmaier et al. 2006).

Interestingly, the slowing of vesicle recycling in cerebellar granule cells due to the lack of cGKII or its inhibition was only observed under strong and sustained stimulation. Hence, the activation of this protein might favor CME and an increase in PI(4,5)P<sub>2</sub>, as occurs at other synapses (Eguchi et al. 2012; Meijering et al. 2004). Impairment of CME will enhance the formation of endosomes, as observed when cGKII is silenced (Collado-Alsina et al. 2014). Recent studies point to the involvement of the monomeric GTPase RhoA in the mechanism by which cGK increases PI(4,5)P<sub>2</sub> (Taoufiq et al. 2013). In other cell types, the action of NO/cGMP is mediated by increasing the expression of RhoA (Sauzeau et al. 2003) and RhoA activates PIP5K by a Rho-kinase mediated mechanism (Oude Weernink et al. 2004; Oude Weernink et al. 2000). For this reason, RhoA is considered a probable link in the regulation of vesicular recycling between the pathway of NO and the action of PI(4,5)P<sub>2</sub>. However, the involvement of other small GTPases like Rab11b cannot be ruled out, this being a ubiquitously expressed protein that plays a major role in the maintenance of the slow recycling endosome pathway and in trafficking cargo to the plasma membrane (Reger et al. 2014).

## **Conclusions and Future directions**

In the cerebellum, the NO-cGMP pathway regulates synaptic transmission, influencing either pre- or post-synaptic events at the synapses established by granule cells. On the other hand, pre- or postsynaptically generated NO is likely to function in an activity dependent manner, locally coordinating pre- and postsynaptic events, as seen at hippocampal synapses (Wang et al. 2005) or rat lateral amygdale synapses following fear conditioning (Ota et al. 2010). However, considering the anatomical organization of the cerebellar granule cell layer and its connectivity, NO from multiple sources may sum spatially to modulate distant synapses regardless of their anatomical connectivity, acting as a volume transmitter (Garthwaite 2016). While further work is required to define the precise mechanisms that may underlie the activity of NO-cGMP regulating synaptic transmission, it has been established as an important element in maintaining high-fidelity synaptic transmission under strong and sustained stimulation.

## Acknowledgements

In this review we have concentrated on the canonical NO/cGMP signaling and its regulation of synaptic transmission in the cerebellum. We apologize if we have not included the results of many colleagues due to space constraints in this chapter. The work was supported by the Spanish MINECO.

## References

- Agullo L, Garcia A (1997) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent cyclic GMP phosphodiesterase activity in granule neurons and astrocytes from rat cerebellum *Eur J Pharmacol* 323:119-125
- Andreeva SG, Dikkes P, Epstein PM, Rosenberg PA (2001) Expression of cGMP-specific phosphodiesterase 9A mRNA in the rat brain *J Neurosci* 21:9068-9076
- Ariano MA, Lewicki JA, Brandwein HJ, Murad F (1982) Immunohistochemical localization of guanylate cyclase within neurons of rat brain *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:1316-1320
- Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA (2010) Glial and neuronal control of brain blood flow *Nature* 468:232-243 doi:10.1038/nature09613
- Bartolome-Martin D, Ramirez-Franco J, Castro E, Sanchez-Prieto J, Torres M (2012) Efficient synaptic vesicle recycling after intense exocytosis concomitant with the accumulation of non-releasable endosomes at early developmental stages *J Cell Sci* 125:422-434 doi:10.1242/jcs.090878
- Bender AT, Beavo JA (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use *Pharmacol Rev* 58:488-520 doi:10.1124/pr.58.3.5
- Bidmon HJ, Gorg B, Palomero-Gallagher N, Schliess F, Gorji A, Speckmann EJ, Zilles K (2005) Bilateral, vascular and perivascular glial upregulation of heat shock protein-27 after repeated epileptic seizures *J Chem Neuroanat* 30:1-16 doi:10.1016/j.jchemneu.2005.03.009
- Bidmon HJ, Mohlberg H, Habermann G, Buse E, Zilles K, Behrends S (2006) Cerebellar localization of the NO-receptive soluble guanylyl cyclase subunits-alpha(2)/beta (1) in non-human primates *Cell Tissue Res* 326:707-714 doi:10.1007/s00441-006-0246-9
- Bidmon HJ, Starbatty J, Gorg B, Zilles K, Behrends S (2004) Cerebral expression of the alpha2-subunit of soluble guanylyl cyclase is linked to cerebral maturation and sensory pathway refinement during postnatal development *Neurochem Int* 45:821-832 doi:10.1016/j.neuint.2004.03.012

- Biel M, Schneider A, Wahl C (2002) Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation *Trends Cardiovasc Med* 12:206-212
- Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A, Hofmann F (1999) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135:151-171
- Boran MS, Garcia A (2007) The cyclic GMP-protein kinase G pathway regulates cytoskeleton dynamics and motility in astrocytes *J Neurochem* 102:216-230 doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04464.x
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase *Nature* 351:714-718 doi:10.1038/351714a0
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide *Nature* 347:768-770 doi:10.1038/347768a0
- Bredt DS, Snyder SH (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9030-9033
- Budworth J, Meillerais S, Charles I, Powell K (1999) Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases *Biochem Biophys Res Commun* 263:696-701 doi:10.1006/bbrc.1999.1444
- Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U (1994) cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets *J Biol Chem* 269:14509-14517
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM (2007) Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity *Nat Rev Neurosci* 8:766-775 doi:10.1038/nrn2214
- Campese VM, Sindhu RK, Ye S, Bai Y, Vaziri ND, Jabbari B (2007) Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain *Brain Res* 1134:27-32 doi:10.1016/j.brainres.2006.11.067
- Casado M, Dieudonne S, Ascher P (2000) Presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors at the parallel fiber-Purkinje cell synapse *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11593-11597 doi:10.1073/pnas.200354297
- Casado M, Isope P, Ascher P (2002) Involvement of presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar long-term depression *Neuron* 33:123-130
- Casteel DE, Boss GR, Pilz RB (2005) Identification of the interface between cGMP-dependent protein kinase I $\beta$  and its interaction partners TFII-I and IRAG reveals a common interaction motif *J Biol Chem* 280:38211-38218 doi:10.1074/jbc.M507021200
- Ciani E, Calvanese V, Crochemore C, Bartesaghi R, Contestabile A (2006) Proliferation of cerebellar precursor cells is negatively regulated by nitric oxide in newborn rat *J Cell Sci* 119:3161-3170 doi:10.1242/jcs.03042
- Clayton EL, Cousin MA (2009) The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles *J Neurochem* 111:901-914 doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06384.x

- Clayton EL, Evans GJ, Cousin MA (2007) Activity-dependent control of bulk endocytosis by protein dephosphorylation in central nerve terminals *J Physiol* 585:687-691 doi:10.1113/jphysiol.2007.137539
- Clayton EL, Evans GJ, Cousin MA (2008) Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation *J Neurosci* 28:6627-6632 doi:10.1523/JNEUROSCI.1445-08.2008
- Clayton EL et al. (2010) Dynamin I phosphorylation by GSK3 controls activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles *Nat Neurosci* 13:845-851 doi:10.1038/nn.2571
- Collado-Alsina A, Hofmann F, Sanchez-Prieto J, Torres M (2017) Altered Synaptic Membrane Retrieval after Strong Stimulation of Cerebellar Granule Neurons in Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase II (cGKII) Knockout Mice *Int J Mol Sci* 18 doi:10.3390/ijms18112281
- Collado-Alsina A, Ramirez-Franco J, Sanchez-Prieto J, Torres M (2014) The regulation of synaptic vesicle recycling by cGMP-dependent protein kinase type II in cerebellar granule cells under strong and sustained stimulation *J Neurosci* 34:8788-8799 doi:10.1523/JNEUROSCI.0103-14.2014
- Contestabile A (2000) Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development *Brain Res Brain Res Rev* 32:476-509
- Contestabile A (2002) Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro *Cerebellum* 1:41-55 doi:10.1080/147342202753203087
- Cremona O, De Camilli P (2001) Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse *J Cell Sci* 114:1041-1052
- Charbonneau H, Beier N, Walsh KA, Beavo JA (1986) Identification of a conserved domain among cyclic nucleotide phosphodiesterases from diverse species *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9308-9312
- Chen MS, Obar RA, Schroeder CC, Austin TW, Poodry CA, Wadsworth SC, Vallery RB (1991) Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a *Drosophila* gene involved in endocytosis *Nature* 351:583-586 doi:10.1038/351583a0
- Cheung G, Cousin MA (2012) Adaptor protein complexes 1 and 3 are essential for generation of synaptic vesicles from activity-dependent bulk endosomes *J Neurosci* 32:6014-6023 doi:10.1523/JNEUROSCI.6305-11.2012
- Chikuda H et al. (2004) Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes *Genes Dev* 18:2418-2429 doi:10.1101/gad.1224204
- D'Angelo E, De Filippi G, Rossi P, Taglietti V (1995) Synaptic excitation of individual rat cerebellar granule cells in situ: evidence for the role of NMDA receptors *J Physiol* 484 ( Pt 2):397-413
- D'Angelo E et al. (2001) Theta-frequency bursting and resonance in cerebellar granule cells: experimental evidence and modeling of a slow  $k^+$ -dependent mechanism *J Neurosci* 21:759-770
- Dawson TM, Snyder SH (1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain *J Neurosci* 14:5147-5159

- de Vente J et al. (2001) Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain *Neuroscience* 108:27-49
- De Vente J, Bol JG, Berkelmans HS, Schipper J, Steinbusch HM (1990) Immunocytochemistry of cGMP in the Cerebellum of the Immature, Adult, and Aged Rat: the Involvement of Nitric Oxide. A Micropharmacological Study *Eur J Neurosci* 2:845-862
- Derbyshire ER, Marletta MA (2012) Structure and regulation of soluble guanylate cyclase *Annu Rev Biochem* 81:533-559 doi:10.1146/annurev-biochem-050410-100030
- Detre JA, Nairn AC, Aswad DW, Greengard P (1984) Localization in mammalian brain of G-substrate, a specific substrate for guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase *J Neurosci* 4:2843-2849
- Dittman J, Ryan TA (2009) Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:133-160 doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113302
- Eccles JC, Ito M, Szentágothai Jn (1967) *The cerebellum as a neuronal machine.* Springer-Verlag, Berlin, New York etc.
- Eguchi K, Nakanishi S, Takagi H, Taoufiq Z, Takahashi T (2012) Maturation of a PKG-dependent retrograde mechanism for exocytotic coupling of synaptic vesicles *Neuron* 74:517-529 doi:10.1016/j.neuron.2012.03.028
- El-Husseini AE, Williams J, Reiner PB, Pelech S, Vincent SR (1999) Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain *J Chem Neuroanat* 17:45-55
- Endo S (2012) G-substrate: the cerebellum and beyond *Prog Mol Biol Transl Sci* 106:381-416 doi:10.1016/B978-0-12-396456-4.00004-3
- Endo S et al. (1999) Molecular identification of human G-substrate, a possible downstream component of the cGMP-dependent protein kinase cascade in cerebellar Purkinje cells *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2467-2472
- Feil R et al. (2003) Impairment of LTD and cerebellar learning by Purkinje cell-specific ablation of cGMP-dependent protein kinase I *J Cell Biol* 163:295-302 doi:10.1083/jcb.200306148
- Feil R, Kleppisch T (2008) NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission *Handb Exp Pharmacol*:529-560 doi:10.1007/978-3-540-74805-2\_16
- Feil S, Zimmermann P, Knorn A, Brummer S, Schlossmann J, Hofmann F, Feil R (2005) Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina *Neuroscience* 135:863-868 doi:10.1016/j.neuroscience.2005.06.051
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions *Hypertension* 23:1121-1131
- Frere SG, Kuisle M, Luthi A (2004) Regulation of recombinant and native hyperpolarization-activated cation channels *Mol Neurobiol* 30:279-305 doi:10.1385/MN:30:3:279
- Garthwaite G, Bartus K, Malcolm D, Goodwin D, Kollb-Sielecka M, Dooleniya C, Garthwaite J (2006) Signaling from blood vessels to CNS axons through

- nitric oxide *J Neurosci* 26:7730-7740 doi:10.1523/JNEUROSCI.1528-06.2006
- Garthwaite J (2005) Dynamics of cellular NO-cGMP signaling *Front Biosci* 10:1868-1880
- Garthwaite J (2008) Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission *Eur J Neurosci* 27:2783-2802 doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x
- Garthwaite J (2016) From synaptically localized to volume transmission by nitric oxide *J Physiol* 594:9-18 doi:10.1113/JP270297
- Garthwaite J, Boulton CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system *Annu Rev Physiol* 57:683-706 doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.003343
- Garthwaite J, Brodbelt AR (1989) Synaptic activation of N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors in the mossy fibre pathway in adult and immature rat cerebellar slices *Neuroscience* 29:401-412
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain *Nature* 336:385-388 doi:10.1038/336385a0
- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S (1989) NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices *Eur J Pharmacol* 172:413-416
- Geiselhoringer A, Gaisa M, Hofmann F, Schlossmann J (2004) Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues *FEBS Lett* 575:19-22 doi:10.1016/j.febslet.2004.08.030
- Gibb BJ, Garthwaite J (2001) Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain *Eur J Neurosci* 13:539-544
- Hartell NA, Furuya S, Jacoby S, Okada D (2001) Intercellular action of nitric oxide increases cGMP in cerebellar Purkinje cells *Neuroreport* 12:25-28
- Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Bohme E, Schultz G (1991) Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme *FEBS Lett* 292:217-222
- Haug LS, Jensen V, Hvalby O, Walaas SI, Ostvold AC (1999) Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ *J Biol Chem* 274:7467-7473
- Heinrich TA, da Silva RS, Miranda KM, Switzer CH, Wink DA, Fukuto JM (2013) Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology *Br J Pharmacol* 169:1417-1429 doi:10.1111/bph.12217
- Heuser JE, Reese TS (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction *J Cell Biol* 57:315-344
- Hill BG, Dranka BP, Bailey SM, Lancaster JR, Jr., Darley-Usmar VM (2010) What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology *J Biol Chem* 285:19699-19704 doi:10.1074/jbc.R110.101618

- Hofmann F, Dostmann W, Keilbach A, Landgraf W, Ruth P (1992) Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase *Biochim Biophys Acta* 1135:51-60
- Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J (2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion *Physiol Rev* 86:1-23 doi:10.1152/physrev.00015.2005
- Ihara H, Kuwamura M, Atsuta M, Nihonmatsu I, Okada T, Mukamoto M, Kozaki S (2006) Expression of neuronal nitric oxide synthase variant, nNOS-mu, in rat brain *Nitric Oxide* 15:13-19 doi:10.1016/j.niox.2005.11.011
- Incontro S, Ciruela F, Ziff E, Hofmann F, Sanchez-Prieto J, Torres M (2013) The type II cGMP dependent protein kinase regulates GluA1 levels at the plasma membrane of developing cerebellar granule cells *Biochim Biophys Acta* 1833:1820-1831 doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.021
- Ito M (2001) Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles *Physiol Rev* 81:1143-1195
- Jones JD, Carney ST, Vrana KE, Norford DC, Howlett AC (2008) Cannabinoid receptor-mediated translocation of NO-sensitive guanylyl cyclase and production of cyclic GMP in neuronal cells *Neuropharmacology* 54:23-30 doi:10.1016/j.neuropharm.2007.06.027
- Jurado S, Sanchez-Prieto J, Torres M (2003) Differential expression of NO-sensitive guanylyl cyclase subunits during the development of rat cerebellar granule cells: regulation via N-methyl-D-aspartate receptors *J Cell Sci* 116:3165-3175 doi:10.1242/jcs.00620
- Jurado S, Sanchez-Prieto J, Torres M (2004) Elements of the nitric oxide/cGMP pathway expressed in cerebellar granule cells: biochemical and functional characterisation *Neurochem Int* 45:833-843 doi:10.1016/j.neuint.2004.03.013
- Jurado S, Sanchez-Prieto J, Torres M (2005) Expression of cGMP-dependent protein kinases (I and II) and neuronal nitric oxide synthase in the developing rat cerebellum *Brain Res Bull* 65:111-115 doi:10.1016/j.brainresbull.2004.12.001
- Kato M et al. (2012) Direct binding and regulation of RhoA protein by cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha *J Biol Chem* 287:41342-41351 doi:10.1074/jbc.M112.421040
- Kaupp UB, Seifert R (2001) Molecular diversity of pacemaker ion channels *Annu Rev Physiol* 63:235-257 doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.235
- Kaupp UB, Seifert R (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels *Physiol Rev* 82:769-824 doi:10.1152/physrev.00008.2002
- Kavalali ET, Jorgensen EM (2014) Visualizing presynaptic function *Nat Neurosci* 17:10-16 doi:10.1038/nn.3578
- Kleinert H, Wallerath T, Fritz G, Ihrig-Biedert I, Rodriguez-Pascual F, Geller DA, Forstermann U (1998) Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways *Br J Pharmacol* 125:193-201 doi:10.1038/sj.bjp.0702039

- Koenig JH, Ikeda K (1989) Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval *J Neurosci* 9:3844-3860
- Kopp-Scheinflug C, Pigott BM, Forsythe ID (2015) Nitric oxide selectively suppresses IH currents mediated by HCN1-containing channels *J Physiol* 593:1685-1700 doi:10.1113/jphysiol.2014.282194
- Lee E, Hayes DB, Langsetmo K, Sundberg EJ, Tao TC (2007) Interactions between the leucine-zipper motif of cGMP-dependent protein kinase and the C-terminal region of the targeting subunit of myosin light chain phosphatase *J Mol Biol* 373:1198-1212 doi:10.1016/j.jmb.2007.08.049
- Lev-Ram V, Wong ST, Storm DR, Tsien RY (2002) A new form of cerebellar long-term potentiation is postsynaptic and depends on nitric oxide but not cAMP *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8389-8393 doi:10.1073/pnas.122206399
- Linden DJ, Connor JA (1992) Long-term Depression of Glutamate Currents in Cultured Cerebellar Purkinje Neurons Does Not Require Nitric Oxide Signalling *Eur J Neurosci* 4:10-15
- Lohmann SM, Walter U, Miller PE, Greengard P, De Camilli P (1981) Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:653-657
- Lopez-Jimenez ME, Bartolome-Martin D, Sanchez-Prieto J, Torres M (2009) Suppression of guanylyl cyclase (beta1 subunit) expression impairs neurite outgrowth and synapse maturation in cultured cerebellar granule cells *Cell Death Differ* 16:1266-1278 doi:10.1038/cdd.2009.57
- Lopez-Jimenez ME, Gonzalez JC, Lizasoain I, Sanchez-Prieto J, Hernandez-Guijo JM, Torres M (2012) Functional cGMP-gated channels in cerebellar granule cells *J Cell Physiol* 227:2252-2263 doi:10.1002/jcp.22964
- Lou X, Paradise S, Ferguson SM, De Camilli P (2008) Selective saturation of slow endocytosis at a giant glutamatergic central synapse lacking dynamin 1 *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17555-17560 doi:10.1073/pnas.0809621105
- Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD (1999) Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus *J Neurosci* 19:10250-10261
- Lujan R, Albasanz JL, Shigemoto R, Juiz JM (2005) Preferential localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel subunit HCN1 in basket cell terminals of the rat cerebellum *Eur J Neurosci* 21:2073-2082 doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04043.x
- Ma X, Sayed N, Beuve A, van den Akker F (2007) NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism *EMBO J* 26:578-588 doi:10.1038/sj.emboj.7601521
- Maffei A, Prestori F, Shibuki K, Rossi P, Taglietti V, D'Angelo E (2003) NO enhances presynaptic currents during cerebellar mossy fiber-granule cell LTP *J Neurophysiol* 90:2478-2483 doi:10.1152/jn.00399.2003
- Marte A, Pepicelli O, Cavallero A, Raiteri M, Fedele E (2008) In vivo effects of phosphodiesterase inhibition on basal cyclic guanosine monophosphate le-

- vels in the prefrontal cortex, hippocampus and cerebellum of freely moving rats *J Neurosci Res* 86:3338-3347 doi:10.1002/jnr.21788
- Matulef K, Zagotta WN (2003) Cyclic nucleotide-gated ion channels *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:23-44 doi:10.1146/annurev.cellbio.19.110701.154854
- Mayer B, Klatt P, Bohme E, Schmidt K (1992) Regulation of neuronal nitric oxide and cyclic GMP formation by Ca<sup>2+</sup> *J Neurochem* 59:2024-2029
- Meijering E, Jacob M, Sarría JC, Steiner P, Hirling H, Unser M (2004) Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images *Cytometry A* 58:167-176 doi:10.1002/cyto.a.20022
- Mergia E, Russwurm M, Zoidl G, Koesling D (2003) Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain *Cell Signal* 15:189-195
- Micheva KD, Buchanan J, Holz RW, Smith SJ (2003) Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling *Nat Neurosci* 6:925-932 doi:10.1038/nn1114
- Micheva KD, Holz RW, Smith SJ (2001) Regulation of presynaptic phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by neuronal activity *J Cell Biol* 154:355-368
- Nakane M, Ichikawa M, Deguchi T (1983) Light and electron microscopic demonstration of guanylate cyclase in rat brain *Brain Res* 273:9-15
- Nakazawa K, Mikawa S, Hashikawa T, Ito M (1995) Transient and persistent phosphorylation of AMPA-type glutamate receptor subunits in cerebellar Purkinje cells *Neuron* 15:697-709
- Nishi A, Watanabe Y, Higashi H, Tanaka M, Nairn AC, Greengard P (2005) Glutamate regulation of DARPP-32 phosphorylation in neostriatal neurons involves activation of multiple signaling cascades *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1199-1204 doi:10.1073/pnas.0409138102
- Ota KT, Monsey MS, Wu MS, Schafe GE (2010) Synaptic plasticity and NO-cGMP-PKG signaling regulate pre- and postsynaptic alterations at rat lateral amygdala synapses following fear conditioning *PLoS One* 5:e11236 doi:10.1371/journal.pone.0011236
- Oude Weernink PA, Schmidt M, Jakobs KH (2004) Regulation and cellular roles of phosphoinositide 5-kinases *Eur J Pharmacol* 500:87-99 doi:10.1016/j.ejphar.2004.07.014
- Oude Weernink PA et al. (2000) Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by Rho-kinase *J Biol Chem* 275:10168-10174
- Palay SL, Chan-Palay V (1974) *Cerebellar cortex: cytology and organization*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York,
- Palmer ZJ et al. (2008) S-nitrosylation of syntaxin 1 at Cys(145) is a regulatory switch controlling Munc18-1 binding *Biochem J* 413:479-491 doi:10.1042/BJ20080069
- Panda K, Ghosh S, Stuehr DJ (2001) Calmodulin activates intersubunit electron transfer in the neuronal nitric-oxide synthase dimer *J Biol Chem* 276:23349-23356 doi:10.1074/jbc.M100687200
- Pifarre P, Garcia A, Mengod G (2007) Species differences in the localization of soluble guanylyl cyclase subunits in monkey and rat brain *J Comp Neurol* 500:942-957 doi:10.1002/cne.21241

- Ramperez A, Sanchez-Prieto J, Torres M (2017) Brefeldin A sensitive mechanisms contribute to endocytotic membrane retrieval and vesicle recycling in cerebellar granule cells *J Neurochem* 141:662-675 doi:10.1111/jnc.14017
- Regehr WG, Carey MR, Best AR (2009) Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers *Neuron* 63:154-170 doi:10.1016/j.neuron.2009.06.021
- Reger AS et al. (2014) Crystal structure of the cGMP-dependent protein kinase II leucine zipper and Rab11b protein complex reveals molecular details of G-kinase-specific interactions *J Biol Chem* 289:25393-25403 doi:10.1074/jbc.M114.575894
- Reiersen GW, Guo S, Mastronardi C, Licinio J, Wong ML (2011) cGMP Signaling, Phosphodiesterases and Major Depressive Disorder *Curr Neuropharmacol* 9:715-727 doi:10.2174/157015911798376271
- Robinson RB, Siegelbaum SA (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function *Annu Rev Physiol* 65:453-480 doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142734
- Rodrigo J et al. (2001) Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation *Brain Res* 909:20-45
- Roy B, Mo E, Vernon J, Garthwaite J (2008) Probing the presence of the ligand-binding haem in cellular nitric oxide receptors *Br J Pharmacol* 153:1495-1504 doi:10.1038/sj.bjp.0707687
- Russwurm M, Koesling D (2004) NO activation of guanylyl cyclase *EMBO J* 23:4443-4450 doi:10.1038/sj.emboj.7600422
- Russwurm M, Wittau N, Koesling D (2001) Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes *J Biol Chem* 276:44647-44652 doi:10.1074/jbc.M105587200
- Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Marionneau C, Loirand G, Pacaud P (2003) RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation *J Biol Chem* 278:9472-9480 doi:10.1074/jbc.M212776200
- Schlichter DJ, Casnellie JE, Greengard P (1978) An endogenous substrate for cGMP-dependent protein kinase in mammalian cerebellum *Nature* 273:61-62
- Schlichter DJ, Detre JA, Aswad DW, Chehraz B, Greengard P (1980) Localization of cyclic GMP-dependent protein kinase and substrate in mammalian cerebellum *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:5537-5541
- Schuman EM, Madison DV (1994) Nitric oxide and synaptic function *Annu Rev Neurosci* 17:153-183 doi:10.1146/annurev.ne.17.030194.001101
- Serulle Y et al. (2007) A GluR1-cGKII interaction regulates AMPA receptor trafficking *Neuron* 56:670-688 doi:10.1016/j.neuron.2007.09.016
- Shibuki K, Kimura S (1997) Dynamic properties of nitric oxide release from parallel fibres in rat cerebellar slices *J Physiol* 498 ( Pt 2):443-452
- Shibuki K, Okada D (1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum *Nature* 349:326-328 doi:10.1038/349326a0

- Shimizu-Albergine M, Rybalkin SD, Rybalkina IG, Feil R, Wolfsgruber W, Hofmann F, Beavo JA (2003) Individual cerebellar Purkinje cells express different cGMP phosphodiesterases (PDEs): in vivo phosphorylation of cGMP-specific PDE (PDE5) as an indicator of cGMP-dependent protein kinase (PKG) activation *J Neurosci* 23:6452-6459
- Shupliakov O, Brodin L (2010) Recent insights into the building and cycling of synaptic vesicles *Exp Cell Res* 316:1344-1350 doi:10.1016/j.yexcr.2010.02.035
- Slepnev VI, De Camilli P (2000) Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis *Nat Rev Neurosci* 1:161-172 doi:10.1038/35044540
- Smith SL, Otis TS (2003) Persistent changes in spontaneous firing of Purkinje neurons triggered by the nitric oxide signaling cascade *J Neurosci* 23:367-372
- Southam E, Morris R, Garthwaite J (1992) Sources and targets of nitric oxide in rat cerebellum *Neurosci Lett* 137:241-244
- Su F et al. (2010) Effects of a selective iNOS inhibitor versus norepinephrine in the treatment of septic shock *Shock* 34:243-249 doi:10.1097/SHK.0b013e3181d75967
- Suarez I, Bodega G, Rubio M, Felipo V, Fernandez B (2005) Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression in the rat cerebellum following portacaval anastomosis *Brain Res* 1047:205-213 doi:10.1016/j.brainres.2005.04.035
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle *Annu Rev Neurosci* 27:509-547 doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412
- Sudhof TC, Rizo J (2011) Synaptic vesicle exocytosis *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 doi:10.1101/cshperspect.a005637
- Taoufiq Z, Eguchi K, Takahashi T (2013) Rho-kinase accelerates synaptic vesicle endocytosis by linking cyclic GMP-dependent protein kinase activity to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate synthesis *J Neurosci* 33:12099-12104 doi:10.1523/JNEUROSCI.0730-13.2013
- Teng H, Lin MY, Wilkinson RS (2007) Macroendocytosis and endosome processing in snake motor boutons *J Physiol* 582:243-262 doi:10.1113/jphysiol.2007.130989
- Vaandrager AB, Ehlert EM, Jarchau T, Lohmann SM, de Jonge HR (1996) N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II *J Biol Chem* 271:7025-7029
- Vaandrager AB et al. (1998) Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel activation *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1466-1471
- van Staveren WC, Steinbusch HW, Markerink-van Ittersum M, Behrends S, de Vente J (2004) Species differences in the localization of cGMP-producing and NO-responsive elements in the mouse and rat hippocampus using cGMP immunocytochemistry *Eur J Neurosci* 19:2155-2168 doi:10.1111/j.0953-816X.2004.03327.x

- Virgili M et al. (1998) Neuronal nitric oxide synthase is permanently decreased in the cerebellum of rats subjected to chronic neonatal blockade of N-methyl-D-aspartate receptors *Neurosci Lett* 258:1-4
- Voglmaier SM, Kam K, Yang H, Fortin DL, Hua Z, Nicoll RA, Edwards RH (2006) Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling *Neuron* 51:71-84 doi:10.1016/j.neuron.2006.05.027
- von Gersdorff H (2001) Synaptic ribbons: versatile signal transducers *Neuron* 29:7-10
- Waldman SA, Murad F (1987) Cyclic GMP synthesis and function *Pharmacol Rev* 39:163-196
- Wang HG et al. (2005) Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins *Neuron* 45:389-403 doi:10.1016/j.neuron.2005.01.011
- Wang W, Nakayama T, Inoue N, Kato T (1998) Quantitative analysis of nitric oxide synthase expressed in developing and differentiating rat cerebellum *Brain Res Dev Brain Res* 111:65-75
- Wang X, Robinson PJ (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system *J Neurochem* 68:443-456
- Wang YT, Linden DJ (2000) Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis *Neuron* 25:635-647
- Wang ZY, McDowell T, Wang P, Alvarez R, Gomez T, Bjorling DE (2014) Activation of CB1 inhibits NGF-induced sensitization of TRPV1 in adult mouse afferent neurons *Neuroscience* 277:679-689 doi:10.1016/j.neuroscience.2014.07.041
- Wenzel EM, Morton A, Ebert K, Welzel O, Kornhuber J, Cousin MA, Groemer TW (2012) Key physiological parameters dictate triggering of activity-dependent bulk endocytosis in hippocampal synapses *PLoS One* 7:e38188 doi:10.1371/journal.pone.0038188
- Wu W, Wu LG (2007) Rapid bulk endocytosis and its kinetics of fission pore closure at a central synapse *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10234-10239 doi:10.1073/pnas.0611512104
- Wu Y, Matsui H, Tomizawa K (2009) Amphiphysin I and regulation of synaptic vesicle endocytosis *Acta Med Okayama* 63:305-323 doi:10.18926/AMO/31822
- Wykes V, Garthwaite J (2004) Membrane-association and the sensitivity of guanylyl cyclase-coupled receptors to nitric oxide *Br J Pharmacol* 141:1087-1090 doi:10.1038/sj.bjp.0705745
- Xia C, Bao Z, Yue C, Sanborn BM, Liu M (2001) Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases *J Biol Chem* 276:19770-19777 doi:10.1074/jbc.M006266200
- Xue J, Tsang CW, Gai WP, Malladi CS, Trimble WS, Rostas JA, Robinson PJ (2004) Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals *J Neurochem* 91:579-590 doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02755.x
- Zabel U et al. (2002) Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide *Nat Cell Biol* 4:307-311 doi:10.1038/ncb775

Zwiller J, Ghandour MS, Revel MO, Basset P (1981) Immunohistochemical localization of guanylate cyclase in rat cerebellum *Neurosci Lett* 23:31-36