

UCH - UF - DOC - BMCTN

B666

C1



**La proteína asociada a microtúbulos 1B
(MAP1B) regula la estructura de
terminales presinápticos en neuronas
maduras *in vitro***

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias con Mención en Biología
Molecular, Celular Y Neurociencias

Facultad De Ciencias

Por

Felipe José Bodaleo Torres

Mayo, 2015

Director de Tesis Dr:

Christian González-Billault

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Felipe José Bodaleo Torres

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Celular, Molecular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 20 de Abril de 2015.

Director de Tesis:

Dr. Christian González-Billault.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marco Tulio Núñez (Presidente).....

Dr. Andrés Couve.....

Dra. Jimena Sierralta.....

Dr. Julio Alcayaga.....



Handwritten signatures in blue ink, including the name "Felipe Bodaleo Torres" and other names, positioned to the right of the typed names and overlapping the stamp.

Para mi abuelo Hugo. Despertaste la curiosidad del Felipe chico que aún perdura, igual que el conocimiento que compartiste conmigo. Por eso, esta tesis es nuestra.



Nací el 3 de abril de 1986 en Santiago de Chile, mi madre es Claudia Torres Meneses y mi padre Harry Bodaleo Sánchez. Cursé educación básica y media en el Colegio Santa Cruz de Santiago. El año 2004 ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, lugar donde me formé como científico.

El año 2010 ingresé al programa de doctorado en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias. El trabajo de mi tesis doctoral fue desarrollado íntegramente en el laboratorio de Dinámica Celular y Neuronal.

Durante esta ya más de una década en la Facultad he conocido a grandes personas y he formado bellas amistades. He conocido a muy buenos profesores, científicos y formadores. Me he desenvuelto en un ambiente que propone un constante desafío intelectual y un sostenido desarrollo personal. Finalmente, estos buenos años en la Universidad me han enseñado que el conocimiento es transversal, que el aprendizaje no es exclusivo de la sala de clases, y que la ciencia trasciende del laboratorio.

El presente trabajo culmina un largo proceso con altos y bajos, y a la vez cierra una de las etapas más enriquecedoras en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Christian por haberme permitido desarrollar esta tesis en el laboratorio de Dinámica Celular y Neuronal (CENEDYN), por su confianza y su apoyo. Agradezco a los miembros de mi comisión evaluadora: Dra. Sierralta, Dr. Alcayaga, Dr. Couve, y al presidente de la comisión Prof. Núñez, por sus críticas constructivas. También al Dr. Felipe Court por su cooperación experimental y a la Dra. Carolina Montenegro.

Muchas gracias a la gente de CENDEYN con la que he tenido el agrado de compartir durante estos años: Elías, Daniel B., David, Pablo L., Erick, Isma, Mauro, Seba, Pablo Rozas, Carlos W., Ernesto. Mención especial a Daniel Henríquez por su ayuda en el mesón, a Pablo Muñoz por los momentos compartidos, y a Cristina Olmos por su amistad, apoyo y ayuda.

A todas las personas que me acompañaron durante este proceso, en especial a Natalia. A mis compañeros del doctorado, a mis amigos Máximo y Severin. A mis amigos de pregrado: Gato, Perú, Nacho, Tamy, Judo y Fibla, y a mis amigos de la vida Talo y Pato.

Por último agradecer a mi familia: mis abuel@s, prim@s y tí@s por su compañía verdaderamente incondicional. A Marcelo por su sabiduría, a Diego por su amistad, a Santiago por ser él, único. Y a los que ya no están, Hugo y Pablo.

Finalmente a mi padre, Harry, por apoyarme y enseñarme desde siempre, y por sobre todo a mi mamá, Claudia, por estar conmigo, por tu preocupación y tu cariño. Su dedicación y esfuerzo me han formado y han hecho posible esta tesis.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE MATERIAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
Interconectividad neuronal y citoesqueleto.....	1
La proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B).....	5
Estructura y función del terminal presináptico.....	9
MAP1B interactúa con la proteína presináptica Snapin.	14
HIPÓTESIS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Animales.....	20
Constructos y Reactivos	20
Anticuerpos.....	21
Cultivos celulares	22
Cultivo primario neuronas corticales.....	22

Co-cultivo primario de neuronas hipocampales - astrocitos	23
Transfección transiente de DNA	24
Inmunocitoquímica	26
<i>Immunoblot</i> (SDS-PAGE)	26
Clonamiento de GST-SNAP25 I y Snapin-BiFC.....	27
Purificación de proteínas recombinantes, ensayos de <i>Pulldown</i>	29
Inmunoprecipitación.....	29
Microscopía electrónica.....	30
Protocolo de reconstrucción basado en programa Imaris (Bitplane).....	31
Protocolo de reconstrucción basado en programa ImageJ	33
Análisis estadístico	34
RESULTADOS	36
Determinación morfológica de compartimentos subcelulares en neuronas maduras	36
La expresión de MAP1B persiste durante etapas adultas.....	36
Análisis de la abundancia relativa de proteínas sinápticas en extractos de proteínas derivados de cerebros de animales WT y MAP1B $-/-$	39
Neuronas MAP1B $-/-$ presentan un aumento en la proporción de terminales presinápticos deslocalizados	42
Neuronas MAP1B deficientes presentan una reducción en la cantidad de contactos sinápticos	47

El fenotipo de terminales presinápticos se encuentra alterado en neuronas MAP1B -/-.....	58
La proteína Snapin endógena prevalece en forma de homo-dímero.....	67
Neuronas MAP1B -/- presentan una disminución en los niveles de la conformación dimérica de Snapin.....	70
DISCUSIÓN.....	79
CONCLUSIONES.....	102
BIBLIOGRAFÍA.....	104
ANEXO.....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. MAP1B interactúa con la proteína presináptica Snapin, y su deficiencia altera la neurosecreción en neuronas maduras.	8
Figura 2. Ciclo de las vesículas sinápticas y estructura de una terminal presináptico.....	12
Figura 3. Fenotipo presináptico en neuronas Snapin KO.....	16
Figura 4. Esquema protocolo co-cultivo neuronas hipocampales-astrocitos.....	25
Figura 5. Clonamiento de la proteína de fusión GST-SNAP-25.	30
Figura 6. Protocolo de generación de reconstrucciones utilizando el programa Imaris.	32
Figura 7. Protocolos de reconstrucción de puntos sinápticos.	35
Figura 8. Determinación morfológica de compartimentos subcelulares en neuronas maduras.	37
Figura 9. MAP1B se expresa en neuronas maduras y en cerebro adulto.	38
Figura 10. Los niveles de expresión de distintas proteínas sinápticas no varían entre genotipos en etapas embrionarias.	40
Figura 11. Los niveles de expresión de distintas proteínas sinápticas no varían en neuronas corticales 13 DIV de distintos genotipos.....	41
Figura 12. Neuronas maduras WT y MAP1B $-/-$ expresan el marcador presináptico Synaptophysin I.....	43
Figura 13. Neuronas MAP1B $-/-$ presentan un aumento en la proporción de terminales presinápticos deslocalizados.....	45
Figura 14. Determinación de contactos sinápticos mediante inmunocitoquímica.	48
Figura 15. Neuronas MAP1B $-/-$ presentan una disminución en la densidad de terminales presinápticos y postsinápticos.....	50

Figura 16. No existe diferencia en el área de terminales presinápticos entre neuronas WT y MAP1B $-/-$, sin embargo estas últimas presentan una reducción en el área de terminales postsinápticos.	52
Figura 17. Existe una disminución en la densidad de contactos sinápticos en neuronas MAP1B $-/-$ determinada mediante inmunocitoquímica.	56
Figura 18. Número de contactos sinápticos se encuentra disminuido en neuronas MAP1B $-/-$, determinado mediante microscopia electrónica.....	57
Figura 19. La densidad de vesículas sinápticas se encuentra disminuida en terminales presinápticos MAP1B $-/-$	59
Figura 20. Neuronas MAP1B $-/-$ exhiben un aumento en la proporción de sinapsis inmaduras.	61
Figura 21. Análisis de propiedades morfológicas de vesículas sinápticas.	63
Figura 22. Neuronas MAP1B $-/-$ exhiben una disminución en la proporción de terminales presinápticos positivos para vesículas de núcleo denso (DCVs).....	66
Figura 23. La proteína Snapin endógena prevalece en forma de homo-dímero.	68
Figura 24. Existe una disminución en los niveles de la conformación dimérica de Snapin neuronas MAP1B $-/-$	71
Figura 25. No hay variaciones en el nivel del dímero de Snapin en neuronas KO Tau.	73
Figura 26. Se observa una disminución en la interacción entre Snapin y el aparato de neurosecreción en cerebros MAP1B $-/-$	74
Figura 27. LC1 no promueve la interacción entre Snapin y GST-SNAP-25 en sistema de expresión heterólogo.....	76
Figura 28. La sobreexpresión de Snapin en neuronas MAP1B $-/-$ revierte el fenotipo de terminales presinápticos huérfanos.	77
Figura 29. Esquema resumen del fenotipo sináptico en neuronas maduras y posible mecanismo de neurosecreción.....	86
Figura 30. Modelos de maduración sináptica.	92

Anexo Figura 1. Comparación entre genotipos de la intensidad de fluorescencia promedio y máxima de puntos pre y postsinápticos generados con Imaris.....	115
Anexo Figura 2. Análisis con programa ImageJ revela un aumento en la proporción de terminales presinápticos deslocalizados en neuronas MAP1B -/-.....	116
Anexo Figura 3. Análisis con programa ImageJ revela que neuronas MAP1B -/- presentan una disminución en el número total de terminales pre y postsinápticos, y en la proporción de contactos sinápticos.....	117
Anexo Figura 4. Se observa señal de fluorescencia basal homogénea y ubicua al reconstituir la estructura de la proteína YFP con la expresión de los vectores BiFC vacíos.	118
Anexo Figura 5. Evaluación de los niveles del dímero de Snapin al inhibir proteasoma y lisosoma.	119

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Listado de anticuerpos primarios	21
Anexo Tabla 1. Resumen del análisis estadístico llevado a cabo considerando el total de puntos generados con el programa Imaris.	114

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Analysis of variance
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Ara-C	Cytosine β -D-arabinofuranoside
AZ	Active zone
BiFC	Bimolecular fluorescence complementation
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CAZ	Cytomatrix of the active zone
cDNA	Complementary DNA
DCV	Dense-Core Vesicle
DIV	Days in vitro
EHD1	EH-domain containing protein 1
GlyR	Glycine receptor
GST	Glutathion S-transferase
GABA	gamma-aminobutyric acid
MAP1B	Microtubule associated protein 1B
LC1	Light chain 1
mEPSC	Miniature excitatory postsynaptic current
MT	Microtúbulos
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyde
PKA	Protein kinase A
PSD-95	Postsynaptic density protein-95
PTV	Piccolo-bassoon transport vesicle
RIM	Rab-interacting molecule
shRNA	Small hairpin RNA
SNAP-25	Synaptosomal-associated protein 25
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor
SNC	Sistema nervioso central
SV	Synaptic vesicle
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
vGAT	Vesicular GABA transporter

RESUMEN

La proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B) se expresa predominantemente durante etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso central, donde cumple un rol regulador clave en procesos tales como axonogénesis, guía axonal y migración neuronal. Sin embargo durante los últimos años se ha demostrado que su expresión continúa durante etapa adulta donde regula la fisiología y morfología de terminales postsinápticos. Más aún, en nuestro laboratorio se ha determinado que MAP1B se encuentra presente en fracciones sinaptosomales presinápticas adultas y que interactúa con la proteína presináptica Snapin. Estos antecedentes nos llevaron a analizar la estructura de terminales presinápticos en neuronas MAP1B deficientes. MAP1B se expresa en axones de neuronas WT adultas, y en distintas regiones de cerebro adulto. Neuronas derivadas de un modelo genético de pérdida de función (MAP1B $-/-$) exhiben un incremento en la proporción de terminales presinápticos que carecen de su contraparte postsináptica, los que podrían corresponder a terminales presinápticos huérfanos. Neuronas MAP1B $-/-$ presentan una disminución en la densidad de contactos sinápticos, caracterizada por una reducción en la cantidad de terminales presinápticos positivos para Synaptophysin I, y de terminales postsinápticos positivos para Homer 1. Mediante análisis de ultra estructura se determinó que existe un incremento en la proporción de contactos sinápticos inmaduros en neuronas deficientes en MAP1B como también una disminución en la densidad de vesículas sinápticas y de vesículas de núcleo denso en terminales presinápticos. Neuronas MAP1B $-/-$ presentan una disminución en específica en los niveles del dímero de la proteína Snapin, mientras no hay variaciones en los niveles de

expresión de otras proteínas presinápticas y postsinápticas tanto durante etapa embrionaria como adulta, promoviendo de esta manera una disminución en la interacción de componentes de la maquinaria de exocitosis de neurotransmisores, fenómeno que se relaciona con el retraso en la neurosecreción observado en neuronas maduras MAP1B $-/-$. La sobreexpresión de Snapin en neuronas MAP1B $-/-$ recupera en parte el fenotipo deslocalizado de terminales presinápticos. Se concluye que neuronas deficientes para MAP1B presentan un fenotipo presináptico anómalo caracterizado por una capacidad disminuida para establecer y mantener sinapsis *in vitro*, lo que se podría explicar por la pérdida de función de Snapin.

ABSTRACT

Microtubule associated protein 1B (MAP1B) is predominantly expressed during early stages in the development of the nervous central system, where it plays a role regulating key processes like axonogenesis, axonal guidance and neuronal migration. However, in the last years it has been demonstrated that MAP1B expression persists during adult stages, where it regulates the physiology and morphology of postsynaptic terminals. Moreover, work done in our laboratory has shown that MAP1B is present in adult presynaptic synaptosomal fractions, and that interacts with the presynaptic protein Snapin. These antecedents led us to analyze the presynaptic terminal structure in MAP1B deficient neurons. MAP1B is expressed in axons of mature WT neurons, and at different adult brain regions. Neurons derived from a MAP1B loss of function genetic model (MAP1B $-/-$) show an increased proportion of presynaptic terminals that lack a postsynaptic compartment, which could correspond to orphan presynaptic terminals. Mature MAP1B $-/-$ neurons present a decrease in the total synaptic contacts density that implies a decrease of Synaptophysin I positive presynaptic terminals, and Homer 1 positive postsynaptic terminals. Ultrastructure analyses reveal that MAP1B $-/-$ neurons have an increased proportion of immature synaptic contacts and a decrease in the synaptic vesicles and large dense core vesicles density in presynaptic terminals. MAP1B $-/-$ neurons present a specific decrease in the relative abundance levels of the dimer of the protein Snapin, while there are not changes in the expression levels of other presynaptic and postsynaptic protein in both embryonic and adult stages, therefore promoting a reduction in the overall interaction levels of the neurotransmitter release machinery, which is related with the delay in neurosecretion

observed in mature MAP1B $-/-$ neurons. Snapin overexpression partially recovers the mislocated phenotype observed for presynaptic terminal in MAP1B $-/-$ neurons. We conclude that MAP1B $-/-$ neurons present an abnormal presynaptic phenotype that causes a diminished capacity for the establishment and maintenance of synaptic contacts *in vitro*, which could be attributed to Snapin loss of function.

INTRODUCCIÓN

Interconectividad neuronal y citoesqueleto.

El sistema nervioso central (SNC) en vertebrados es capaz de ejecutar procesos múltiples y complejos que basan su funcionalidad en el establecimiento de redes neuronales. El conocimiento de esta interconectividad neuronal data de fines del siglo XIX, a partir del trabajo pionero de Santiago Ramón y Cajal que demostró que las neuronas son unidades anatómicas y funcionales autónomas capaces de comunicarse entre sí (Cajal, 1888). En este contexto, la precisión tanto espacial como temporal para una correcta comunicación entre neuronas se sustenta en el adecuado establecimiento y mantención de contactos sinápticos. En el SNC una sinapsis se define como un sitio de contacto funcionalmente asimétrico formado entre neuronas, que lleva a cabo la transmisión rápida y eficiente de señales desde una célula neuronal a otra (Garner y col., 2002). La mayoría de las neuronas en el SNC de vertebrados se comunica a través de sinapsis químicas, las que en respuesta a señales eléctricas correspondientes a potenciales de acción presinápticos, producen la liberación de neurotransmisores que finalmente evocan una respuesta eléctrica en el terminal postsináptico dendrítico (Waites y col., 2005). Desde un punto de vista funcional, una sinapsis química puede ser de naturaleza excitatoria, inhibitoria o moduladora. En el SNC de mamíferos la vasta mayoría corresponde a sinapsis excitatorias que utilizan glutamato como neurotransmisor. La neurotransmisión inhibitoria es mediada por glicina o por ácido γ -aminobutírico (GABA), mientras que la neurotransmisión moduladora es dependiente de noradrenalina, serotonina (5-HT), dopamina, acetilcolina (ACh) y neuropéptidos, entre otros (Garner y col., 2002). Desde

un punto de vista estructural una sinapsis química glutamatérgica está compuesta por un terminal presináptico axonal que contiene vesículas sinápticas (*synaptic vesicles, SV*) cargadas de glutamato, una hendidura sináptica y un terminal postsináptico dendrítico (Garner y col., 2000), en el que se recibe, interpreta y propaga el *input* sináptico entrante, fenómeno que en neuronas maduras ocurre en estructuras altamente especializadas denominadas espinas dendríticas (Scannevin y Huganir, 2000). Múltiples son los elementos que regulan la función sináptica en ambos compartimentos, como por ejemplo GTPasas pequeñas de la familia Rho (Wang y col., 2005), múltiples proteínas kinasas (Lu y Hawkins, 2006), receptores de membrana (Betke y col., 2012), proteínas de andamiaje y el citoesqueleto. El citoesqueleto neuronal está compuesto por tres elementos principales: neurofilamentos, microfilamentos de actina y microtúbulos (MT) (Dalpé y col., 1998), y se ha descrito que actina y microtúbulos se encuentran presentes tanto en terminales presinápticos como postsinápticos en sinapsis glutamatérgicas.

Está ampliamente documentado que el citoesqueleto de actina es el principal componente estructural de las espinas dendríticas postsinápticas, donde regula la formación, morfología y dinámica de estas estructuras (Hotulainen y Hoogenraad, 2010; Fischer y col., 1998 y Matus, 2000). Sin embargo no fue sino hacia fines de la década del 2000 que se determinó la presencia de MT de manera transitoria y en respuesta a actividad, en un pequeño porcentaje de espinas dendríticas en neuronas maduras, donde regulan la fisiología y dinámica de estas estructuras (Hu y col., 2008; Jaworski y col., 2009). En este contexto se ha demostrado que los MT promueven la estabilización de espinas dendríticas maduras a través del incremento de la proteína de andamio PSD-95 en densidades postsinápticas (Hu y col., 2011), y que el aumento en el volumen de espinas dendríticas depende de la activación de

receptores de glutamato del tipo NMDA requiere de la invasión transiente de MT (Merriam y col., 2011). Los antecedentes recién expuestos dan cuenta que los MT regulan la fisiología y estructura de terminales postsinápticos, sin embargo a la fecha, tanto la presencia como el rol de los MT en terminales presinápticos de sinapsis excitatorias están lejos de ser comprendidos a cabalidad.

El citoesqueleto de actina regula la fisiología de terminales presinápticos. Se ha determinado la presencia de F-actina en terminales presinápticos, preferentemente concentrada alrededor del *cluster* de vesículas sinápticas donde cumple un rol como sistema de andamiaje para otras moléculas regulatorias, como Synapsin 1a, en el proceso de liberación de neurotransmisores (Sankaranarayanan y col., 2003). Similarmente, se determinó en sinapsis reticuloespinales de lamprea, que los microfilamentos de actina polimerizan de manera dependiente de actividad, y que localizan preferencialmente en la periferia del botón sináptico, donde regulan la endocitosis y reciclaje de vesículas sinápticas desde la zona activa (Shupliakov y col., 2002; Bourne y col., 2006). Adicionalmente, cuando se promueve la despolimerización del citoesqueleto de actina utilizando la droga latrunculina A, existe un aumento en la liberación de neurotransmisores evocada como también en la probabilidad de liberación de vesículas (Morales y col., 2000). Si bien, los antecedentes que dan cuenta de la presencia y función del citoesqueleto de actina en terminales presinápticos son abundantes, estudios sobre MT presinápticos se basan principalmente en análisis de la ultra estructura de terminales presinápticos. Mediante microscopia electrónica se ha observado la presencia de filamentos de aproximadamente 20-30 nm de diámetro correspondientes a MT, tanto en regiones axonales como en terminales presinápticos, donde se encuentran en asociación con vesículas sinápticas (Gray 1975). Sumado a esto, al analizar la ultra estructura de terminales presinápticos y de

sinaptosomas purificados a partir de cortezas de rata se determinó la presencia de MT en estas estructuras en contacto directo con mitocondrias (Chan y Bunt, 1977), y que estos MT sinaptosomales son dinámicos, puesto que son capaces de desensamblarse en respuesta al frío y volver a ensamblarse posteriormente en filamentos organizados (Gordon-Weeks y col., 1982). Sin embargo, utilizando protocolos de fijación distintos, solo se ha determinado la presencia de MT sinaptosomales, y no así la localización de MT en terminales presinápticos asociados con vesículas sinápticas (Gray y col., 1982), dejando en evidencia la existencia de una variabilidad empírica asociada al reconocimiento y categorización de MT en terminales presinápticos. Utilizando microscopía electrónica de criofractura se logró determinar que MT se encuentran presentes en la periferia de terminales presinápticos donde interactúan con vesículas sinápticas a través de la proteína Synapsin 1 (Hirokawa y col., 1989), sugiriendo que es a través de los MT que las vesículas sinápticas son posicionadas en el terminal presináptico. En forma complementaria, se ha descrito que MT presinápticos se encuentran presentes en unión neuromuscular de *Drosophila*, formando un manojo de MT en forma de bucle o *loop*, y jugando un rol clave en el crecimiento y mantención de la estructura sináptica (Miech y col., 2008; Wong y col., 2014).

El citoesqueleto de MT se ha definido como un efector clave en la señalización dependiente de neurotransmisores, la que regula la dinámica de MT a través de modificaciones post-traduccionales de la tubulina, la unión de proteínas asociadas a MT y la liberación de moléculas de segundos mensajeros que interactúan con MT, en adición a la regulación en los niveles de expresión de tubulina. Esta regulación es bidireccional, es decir modificaciones en la dinámica de MT repercuten a su vez en la función sináptica (Gardiner y col., 2011). De los

factores presentados anteriormente, se menciona la regulación de la dinámica de MT dependiente de proteínas que se asocian a ellos.

Distintos tipos de proteínas que se asocian a microtúbulos (*Microtubule-associated proteins*, MAPs) se encuentran en células eucariontes. Existen MAPs que se unen específicamente al extremo más (+) de MT, o al extremo menos (-) de MT en el centrosoma. Muchas MAPs se unen a lo largo del entramado de los MT, y dentro de esta categoría se encuentran las MAPs enzimáticamente activas, tales como kataninas. Existen también MAPs estructurales (Halpain y Dehmelt, 2006), y dentro de este último grupo destacan la familia MAP2/Tau (Dehmelt y Halpain, 2004) y la familia de proteínas MAP1, compuesta por tres miembros, MAP1A, MAP1B y MAP1S, los que se encuentran codificados en distintos genes y que estabilizan MT con diferente eficiencia (Halpain y Dehmelt, 2006).

La proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B).

La proteína MAP1B (*Microtubule-associated protein 1B*) consta de 2459 aminoácidos de acuerdo a la secuencia de rata, y se expresa como un pre-péptido de 320 – 330 kDa de masa molecular aparente, el cual mediante procesamiento proteolítico genera una cadena liviana o LC1 de 32 kDa y una cadena pesada (HC) de 300 kDa aproximadamente. Tanto MAP1B-LC1 como MAP1B-HC tienen la capacidad de homo-dimerizar, homo-oligomerizar y de interactuar entre ellas. MAP1B no posee dominios estructurales conservados con otras proteínas, excepto la presencia de dominios de unión a actina y dominios de unión a MT, tanto en la cadena pesada como en la cadena liviana. Además, en la cadena pesada se encuentra un dominio MTA (*microtubule assembly helping site*) el que promueve el ensamblaje de MT (Halpain y Dehmelt, 2006; Riederer, 2007; Villarroel-Campos y González-Billault, 2014).

MAP1B se expresa predominantemente en sistema nervioso central y es la primera MAP en ser expresada durante el desarrollo, donde alcanza máximos niveles de expresión durante etapas embrionarias (Riederer y col., 1986 y Tucker y col., 1989), regulando procesos tales como axonogénesis (González-Billault y col., 2001), guía axonal (del Rio y col., 2004) y migración neuronal (González-Billault y col., 2005). Posteriormente, la expresión de MAP1B decae durante etapas post-natales, es por esto que los estudios de la funcionalidad de esta proteína se basan principalmente en análisis durante etapas tempranas del desarrollo del SNC. Sin embargo existe evidencia que da cuenta que la expresión de MAP1B persiste en distintas zonas cerebrales durante etapas adultas, donde los niveles de MAP1B permanecen elevados en regiones de alta plasticidad neuronal, como por ejemplo el bulbo olfatorio, hipocampo, cerebelo y algunos núcleos hipotalámicos (Schoenfeld y col., 1989; Nothias y col., 1996). Concordante con estos antecedentes, se ha determinado que los niveles de MAP1B permanecen constantes durante el proceso de sinaptogénesis *in vitro*, donde existe un aumento en la proporción de MAP1B que se encuentra asociada a membrana plasmática (Kitamura y col., 2006). Mediante inmunotinción acoplada a microscopía electrónica se determinó la presencia de MAP1B en asociación con MT en dendritas en cortezas de animales adultos. Adicionalmente, se observó señal positiva para MAP1B en regiones post-sinápticas en un pequeño porcentaje del total de sinapsis analizadas, sugiriendo una posible función para MAP1B en la regulación sináptica durante etapas adultas (Kawakami y col., 2003). Años más tarde esta observación fue reproducida mediante microscopía confocal, donde se observó la presencia de MAP1B en espinas dendríticas positivas para F-actina en neuronas maduras *in vitro*. Más aun, neuronas maduras derivadas de un animal deficiente para MAP1B presentan una disminución en la proporción de espinas dendríticas maduras, caracterizadas por una

morfología del tipo *mushroom*, y un consecuente aumento en espinas dendríticas inmaduras del tipo filopodio. Funcionalmente, neuronas carentes de MAP1B exhiben una disminución tanto en la amplitud como en la frecuencia de corrientes excitatorias postsinápticas en miniatura (mEPSC), dejando en evidencia un rol de MAP1B en la regulación sináptica (Tortosa y col., 2011). Sumado a esto se ha determinado que MAP1B, a través de su interacción con la proteína postsináptica GRIP1, regula la endocitosis de receptores AMPA dependiente de actividad en neuronas corticales maduras *in vitro* (Davidkova y Carroll, 2007). Relacionado con esto, recientemente se demostró que MAP1B regula la plasticidad estructural de espinas dendríticas y la remoción de receptores AMPA desde sinapsis durante el fenómeno de depresión a largo plazo (*long-term depression*, LTD) (Benoist y col., 2013). Si bien en los últimos años se ha descrito que MAP1B que se expresa en etapas adultas, y que en este contexto temporal regula la fisiología y estructura de terminales postsinápticos, a la fecha se tiene poco conocimiento sobre algún rol putativo de esta proteína en la regulación de la función de terminales presinápticos. Existen antecedentes que permiten relacionar a MAP1B, con la fisiología presináptica, por ejemplo se ha observado que MAP1B a través de su cadena liviana LC1 interactúa específicamente con el canal de calcio sensible a voltaje (Ca_v2.2) ubicado en terminales presinápticos (Leenders y col., 2008, y Gandini y col., 2014), regulando la degradación proteasomal del canal sin alterar sus propiedades cinéticas intrínsecas (Gandini y col., 2014). Por otro lado, se ha determinado que en *Drosophila* el homólogo estructural de MAP1B, la proteína *Futsch*, se encuentra presente en unión neuromuscular, específicamente en el terminal presináptico, donde regula la liberación de neurotransmisores y la densidad de zonas activas, a través de su interacción específica con las proteínas presinápticas *Brushpilot* y

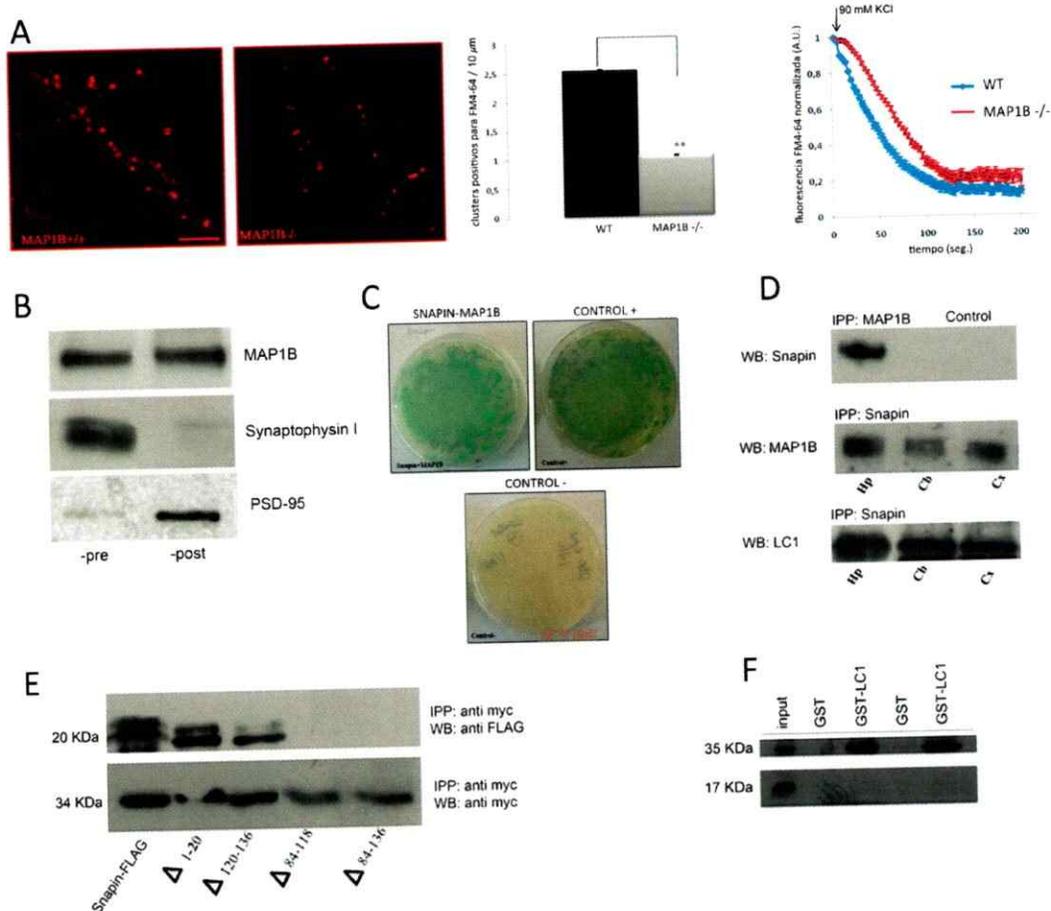


Figura 1. MAP1B interactúa con la proteína presináptica Snapin, y su deficiencia altera la neurosecreción en neuronas maduras. (A) Panel izquierda, ensayo de carga y liberación de sonda FM4-64 en neuronas maduras. Imágenes representativas de neuronas maduras WT y MAP1B^{-/-} cargadas con la sonda fluorescente FM4-64, donde se aprecia que neuronas MAP1B^{-/-} presentan una disminución en la cantidad de *clusters* positivos para esta sonda, los que corresponden a terminales presinápticos activos (neuronas WT 2.5 ± 0.27 clusters / 10 μ m, neuronas MAP1B^{-/-} 1.07 ± 0.07 clusters / 10 μ m). Panel derecha, Neuronas MAP1B^{-/-} presentan un retraso en la cinética de pérdida de fluorescencia correspondiente a la sonda FM4-64, lo que se interpreta como un retraso en la liberación de neurotransmisores en neuronas MAP1B^{-/-} (n=30 para cada genotipo). (B) *Inmunoblot* de extractos sinaptosomales adultos presinápticos positivos para Synaptophysin I, y postsinápticos positivos para PSD-95. MAP1B se expresa en ambos compartimentos. (C) Levaduras de la cepa AH109 co-transformadas con vectores pGBKT7-LC1 y pGDAT7-Snapin crecen en medio QDO altamente restrictivo y son positivas para ensayo de β -galactosidasa, lo cual confirma la interacción de LC1 y Snapin en este sistema de expresión heterólogo. Control positivo, levaduras co-transformadas con pGBKT7-p53 y pGDAT7-T (P53 y T corresponden a proteínas que se sabe interactúan). Control negativo, levaduras co-transformadas con pGBKT7-p53 y pGDAT7 vacío. (D) Inmunoprecipitación recíproca a partir de cerebro adulto donde se confirma la interacción de Snapin y MAP1B endógenas en distintas regiones (Hp, hipocampo. Cb, cerebelo. Cx,

corteza). (E) Inmunoprecipitación recíproca de LC1 y distintas regiones de Snapin recombinantes. Se demuestra que LC1 interactúa con Snapin a través de la región C-terminal (84-118 aa) de esta última. (F) Ensayos de *pulldown* utilizando GST-LC1 demuestra la interacción de MAP1B predominantemente con Snapin en su forma dimérica en cerebro adulto. Trabajo no publicado correspondiente a la tesis doctoral de Dr. Carolina Montenegro.

Cacophony (Lepicard y col., 2014). Trabajo no publicado desarrollado en nuestro laboratorio describió la presencia de MAP1B en fracciones sinaptosomales postsinápticas adultas, positivas para la proteína PSD-95. Sumado a esto se encontró a MAP1B presente en fracciones sinaptosomales presinápticas, positivas para la proteína Synaptophysin I, lo que sugiere la participación de MAP1B en procesos relacionados con la función presináptica durante etapas adultas (Figura 1B). En esta misma línea se ha determinado la participación de MAP1B en procesos presinápticos, ya que ensayos de liberación de vesículas utilizando la sonda fluorescente FM4-64, dan cuenta de un retraso en la neurosecreción desde terminales presinápticos en neuronas MAP1B *-/-*, al igual que una disminución en la cantidad de terminales presinápticos activos (Figura 1A), cuya estructura y composición se describe a continuación.

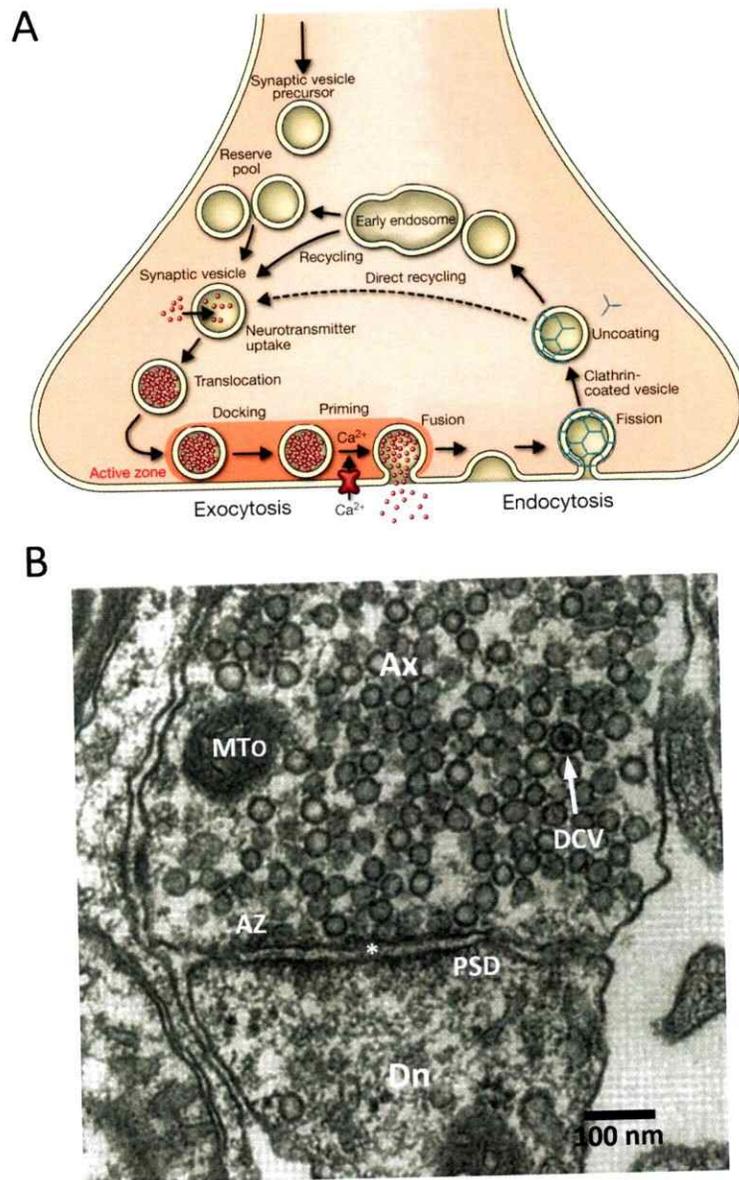
Estructura y función del terminal presináptico.

La arquitectura altamente especializada característica de un terminal presináptico permite a este compartimiento recibir un potencial de acción y producir consiguientemente la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica, en respuesta a una entrada local de Ca^{+2} extracelular. En la mayoría de los terminales presinápticos tan solo el 10-20% de los

potenciales de acción gatillan neurosecreción, ya que la relación entre el estímulo eléctrico y la liberación de neurotransmisores está regulada tanto por mensajeros intracelulares como por moduladores extracelulares, y se ve dramáticamente alterada por la utilización repetitiva de la sinapsis (Südhof 2004). Esta regulación de los componentes moleculares que forman parte de un terminal presináptico finalmente converge en un fenómeno común: el ciclo de las vesículas sinápticas, en el cual todas las etapas que lo conforman colaboran directa o indirectamente para producir en forma rápida, regulada y repetitiva la liberación de neurotransmisores (Südhof, 1995). Secuencialmente, las vesículas sinápticas en yuxtaposición (0 – 30 nm de distancia) a la membrana plasmática presináptica se consideran en estado “*docked*”. El proceso que transforma a las vesículas sinápticas en competentes para la fusión instantánea en respuesta a un influjo de Ca^{+2} se define como “*priming*”, y se considera el paso inmediatamente anterior al fenómeno de fusión de membranas y exocitosis de neurotransmisores. Luego, las vesículas depletadas de neurotransmisores son endocitadas en un fenómeno dependiente de clatrina y de actina, son posteriormente destinadas a un intermediario endosomal, y finalmente son recicladas desde este organelo para ingresar nuevamente al ciclo (Figura 2A) (Murthy y de Camilli, 2003; Gundelfinger y Fejtova, 2012, y Jahn y Fasshauer, 2012). La exocitosis de vesículas sinápticas se encuentra restringida a una pequeña sección de la membrana plasmática presináptica, denominada como zona activa (*active zone, AZ*) (Südhof, 2012), la que presenta un entramado de proteínas que organiza espacial y funcionalmente la neurosecreción, denominado citomatrix de la zona activa (*cytomatrix at the active zone, CAZ*) (Gundelfinger y Fejtova, 2012). Análisis de ultra estructura mediante microscopia electrónica revelan que los botones presinápticos se encuentran cargados de vesículas sinápticas, las que se observan como pequeñas estructuras circulares de

aproximadamente 40 nm, con una región central clara. El conjunto de la AZ y de CAZ se aprecia como una región electrón-densa adyacente a un terminal postsináptico. En adición se ha descrito que las vesículas sinápticas se encuentran interactuando con otras vesículas sinápticas o con componentes del citoesqueleto presináptico como microfilamentos de actina o MT a través de pequeñas estructuras fibrilares, que corresponderían a proteínas de la familia de las Synapsins (Siksou y col., 2011). Otros elementos como vesículas de núcleo denso (*dense-core vesicles*, DCV) y mitocondrias se encuentran en botones sinápticos (Sorra y col., 2006). La ultraestructura y morfología de un terminal presináptico característico se puede observar en la Figura 2B.

Dos grandes grupos de proteínas regulan la exocitosis de neurotransmisores. En primer lugar están las proteínas que forman parte de la CAZ, donde destacan proteínas de andamio como Piccolo y Bassoon, las que a través de su interacción con RIM (Rab interacting protein) y Munc-13, organizan y mantienen la integridad estructural de la AZ (Gundelfinger y Fejtova, 2012). Por otro lado se encuentran los miembros de la familia de proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor*), las que juegan un papel clave en el fenómeno de neurosecreción. Las proteínas pertenecientes a esta familia se caracterizan por poseer dominios estructurales denominados motivos SNARE, los que establecen interacciones proteína-proteína del tipo *coiled coil* llamados complejos SNARE, a los que se les ha atribuido un rol central en el proceso de fusión de membranas (Rizo y col., 2006). Diversos estudios han demostrado que tres proteínas de esta familia son las que establecen el complejo SNARE indispensable para la exocitosis en terminales presinápticos: La proteína Synaptobrevin o VAMP2 la cual corresponde a una v-SNARE (*vesicle-SNARE*) ubicada en la



.Figura 2. Ciclo de las vesículas sinápticas y estructura de una terminal presináptico. (A) Esquema del ciclo de las vesículas sinápticas. Modificado de Jahn y Fasshauer, 2012. **(B)** Ultra estructura de un terminal presináptico, cargado de vesículas sinápticas de núcleo claro. También se observa una mitocondria (MTo) y una vesícula de núcleo denso (*dense core vesicle*, DCV), señalada con una flecha. Se distingue la zona activa (*active zone*, AZ) presináptica y la densidad postsináptica (*postsynaptic density*, PSD), separadas por la hendidura intersináptica que es señalada con un asterisco. Ax, Axón y Dn, dendrita. Barra de tamaño 100 nm. Modificado de Schiavo y col., 2000.



membrana de la vesícula sináptica, y las proteínas SNAP-25 y Syntaxin-1, t-SNAREs (*target-SNAREs*) ubicadas en la membrana plasmática de los terminales presinápticos (Rizo y Rosenmund, 2008).

Otro componente que cumple un rol especializado en la exocitosis de neurotransmisores es la proteína Synaptotagmin I, que se ubica en la membrana de las vesículas sinápticas y se ha propuesto como un sensor de Ca^{+2} intracelular que permite la liberación sincronizada de neurotransmisores. Synaptotagmin I al unir iones Ca^{+2} en sus dominios citoplasmáticos permite el acercamiento de las membranas que se encuentran ya adyacentes debido a la formación previa del complejo SNARE, ocurriendo de este modo el paso final en el proceso de formación del poro de fusión y exocitosis de neurotransmisores (Rizo y col., 2006).

Ensayos *in vitro* han demostrado que Synaptotagmin I interactúa con el complejo SNARE, específicamente con el extremo carboxilo terminal de la proteína SNAP-25. Esta interacción es dependiente de Ca^{+2} y juega un rol crítico en el mecanismo de exocitosis gatillado por Ca^{+2} (Zhang y col., 2002), lo cual da cuenta de una interacción directa entre la maquinaria de fusión y el sensor de Ca^{+2} Synaptotagmin I. Complementariamente, antecedentes indican que la unión entre estas dos proteínas puede ocurrir en forma independiente de calcio (Rickman y Davletov, 2003; Pan y col., 2009), sugiriendo que la unión entre Synaptotagmin I y SNAP-25 regula o participa en procesos previos a la liberación de neurotransmisores propiamente tal. Estudios realizados en células cromafines embrionarias derivadas de ratones nulos para Synaptotagmin I y nulos para SNAP-25 muestran que la interacción entre ambas proteínas es fundamental para el normal posicionamiento de las

vesículas sinápticas en estado *docked* (de Wit y col., 2009). A partir de esto se concluye que la unión entre Synaptotagmin I y SNAP-25 es clave en el proceso de liberación de neurotransmisores, ya que por un lado participa en la correcta localización de vesículas sinápticas en la zona activa, y también permite la fusión mediada por calcio de la membrana vesicular con la membrana plasmática del terminal presináptico.

MAP1B interactúa con la proteína presináptica Snapin.

Con el propósito de encontrar nuevas proteínas que interactúen con MAP1B durante etapas adultas, en nuestro laboratorio se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido en el que se utilizó a LC1 como cebo contra una genoteca de cerebro de ratón adulto. Entre los distintos candidatos de interacción obtenidos en dicho análisis, destaca la proteína presináptica Snapin o SNAPAP (*SNARE-associated protein*) (Figura 1C). Esta interacción se comprobó mediante ensayos de inmunoprecipitación a partir de extractos protéicos provenientes de cerebros adultos (Figura 1D). Se demostró que LC1 interactúa con Snapin a través del extremo carboxilo terminal de esta última (Figura 1E), y que esta interacción ocurre predominantemente con Snapin en su forma de dímero (Figura 1F).

La proteína Snapin se ha descrito como una proteína de aproximadamente 15 kDa, cuya expresión se encuentra enriquecida en tejido neuronal (Ilardi y col., 1999). La estructura secundaria de Snapin consta de un dominio putativo hidrofóbico transmembrana en el extremo amino terminal y de un dominio "*coiled coil*" en su extremo carboxilo terminal, a través del cual interactúa con componentes del complejo SNARE, específicamente con SNAP-25 y Synaptotagmin I (Vites y col., 2004 y Pan y col., 2009). Si bien Snapin fue descrita por primera vez como una proteína transmembrana que se localiza específicamente en vesículas sinápticas

(Ilardi y col., 1999), también existen antecedentes que postulan a Snapin como una proteína citoplasmática que purifica tanto con fracciones solubles como con fracciones de vesículas sinápticas (Buxton y col., 2003 y Vites y col., 2004). Snapin prevalece en forma de homodímero, el cual se establece mediante un enlace disulfuro generado a través de su único residuo cisteína (Cisteína 66). *In vitro*, la interacción de Synaptotagmin I y SNAP-25 con el homodímero de Snapin aumenta considerablemente en comparación a la interacción establecida con el monómero de Snapin (Pan y col., 2009). Estudios a partir de homogenizado de cerebro provenientes de ratón nulo para Snapin han demostrado que en este contexto genético la interacción entre SNAP-25 y Synaptotagmin I se ve disminuida en comparación a una condición genética silvestre. Por otro lado, la ausencia de Snapin en células cromafines embrionarias derivadas de animales nulos para Snapin reducen considerablemente la cantidad de vesículas que forman parte de los *pools* liberables presentes en estas células (Tian y col., 2005). Además, neuronas corticales derivadas del ratón *knock-out* (KO) para Snapin presentan desincronización en la fusión de vesículas sinápticas con la membrana del terminal presináptico (Pan y col., 2009). Desde la perspectiva de la regulación de sus funciones, Snapin puede ser fosforilada en el residuo serina 50 por PKA (*cAMP dependent protein kinase A*). Ensayos *in vitro* dan cuenta que la interacción de Synaptotagmin I con el complejo SNARE se ve potenciada al incubar extractos protéicos sinaptosomales con la forma fosfomimética de Snapin, en donde la serina 50 ha sido sustituida por un residuo de ácido aspártico (Chheda y col., 2001). Por otro lado se ha descrito que Snapin interactúa con la proteína EHD1 (*Eps15 homology domain-containing protein*), y que esta interacción inhibe la asociación de Snapin con SNAP-25 y de Synaptotagmin I (Wei y col., 2010). Desde un punto de vista estructural, neuronas

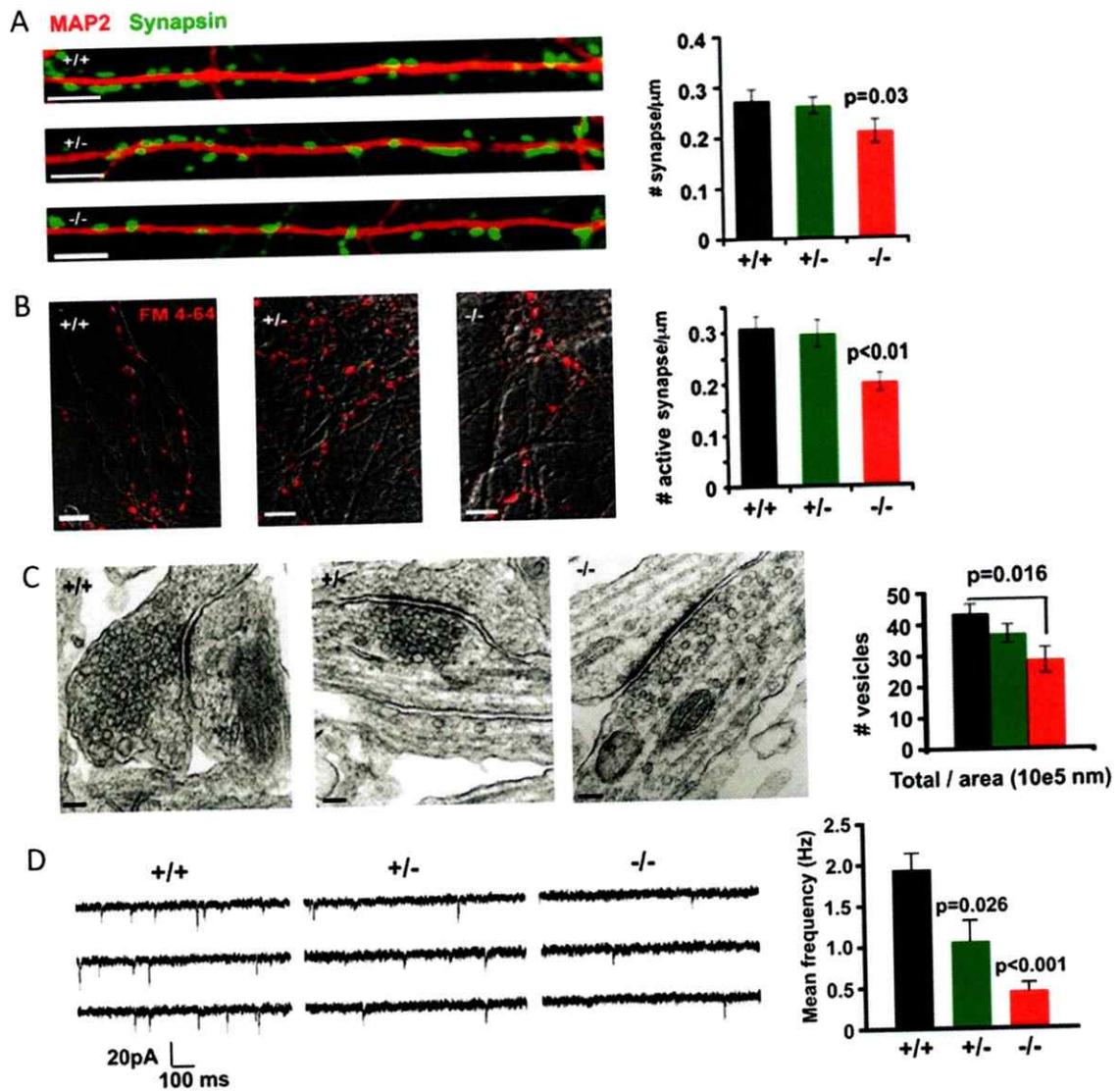


Figura 3. Fenotipo presináptico en neuronas Snapin KO. Neuronas Snapin KO presentan: **(A)** disminución en el número de terminales presinápticos positivos para la proteína Synapsin, **(B)** reducción en la cantidad de terminales presinápticos activos cargados con la sonda fluorescente FM4-64, **(C)** reducción en la densidad de vesículas sinápticas en terminales presinápticos, **(D)** disminución en la frecuencia de corrientes excitatorias postsinápticas en miniatura (mEPSC). Imagen modificada de Pan y col., 2009.

hipocámpales derivadas del animal Snapin KO, exhiben un fenotipo presináptico alterado (Figura 3). Neuronas Snapin KO presentan una disminución de terminales presinápticos activos.

Análisis de la ultra estructura revelan que existe una disminución en la densidad de vesículas sinápticas en terminales presinápticos en neuronas Snapin KO, sin existir variaciones en la morfología de las vesículas sinápticas entre genotipos. Desde un punto de vista funcional y al igual que lo observado en neuronas MAP1B $-/-$, neuronas Snapin KO presentan una reducción en la frecuencia de corrientes postsinápticas en miniatura (mEPSC) (Pan y col., 2009), sugiriendo un posible acoplamiento funcional entre estas dos proteínas.

En base a estos antecedentes, en esta tesis de doctorado planteamos estudiar el rol de MAP1B en la regulación de la estructura y el establecimiento de terminales presinápticos en neuronas maduras. Para ello, se propone la siguiente hipótesis de trabajo.

HIPÓTESIS

La proteína MAP1B regula la estructura de terminales presinápticos en neuronas maduras, participando así en el fenómeno de establecimiento de contactos sinápticos *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la pérdida de función de MAP1B en neuronas maduras afecta la estructura de los terminales presinápticos y el establecimiento de contactos sinápticos *in vitro*, y evaluar la participación de Snapin en este fenómeno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar la distribución, estructura y morfología de terminales presinápticos en neuronas maduras WT y MAP1B *-/-* *in vitro*.
 - i. Caracterizar la expresión de distintas proteínas pre y post-sinápticas en distintas etapas en los contextos genéticos WT y MAP1B *-/-*.

- ii. Implementar un protocolo de análisis automatizado para la caracterización de terminales presinápticos. Evaluar parámetros estructurales de terminales presinápticos y densidad de contactos sinápticos en neuronas maduras WT y MAP1B *-/- in vitro*.
 - iii. Analizar mediante microscopía electrónica la ultra estructura de terminales presinápticos.
- 2) Evaluar la expresión de Snapin y su interacción con proteínas presinápticas involucradas en neurosecreción en neuronas MAP1B *-/-*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones (*mus musculus*, cepa NMRI) WT y MAP1B +/-, los que fueron generados mediante la técnica de *gene trapping* (Chowdhury y col., 1997). Para cultivo de astrocitos se utilizaron hembras preñadas de rata (*rattus norvegicus*, cepa *Sprague Dawley*). La manipulación y eutanasia de animales se llevó a cabo siguiendo el protocolo de bioética aprobado por la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Constructos y Reactivos

Se utilizaron los siguientes shRNAs (Broad Institute) contra Snapin: 182818 (Secuencia blanco CAACCTAGCTACAGAACTGTG), 177190 (Secuencia blanco GATCAATGAGGATCAGAAAGT), 182773 (Secuencia blanco CCGGGAACAAATTGACAACCT). Se utilizaron los siguientes constructos de expresión: Snapin FLAG *full lenght* (facilitado por Walter Hunziker), pCAG-GFP y pCAG-RFP (Amara), pCDNA-LC1myc, pGEX3.1 (Life Sciences). Vectores BiFC (NYFP y CYFP) fueron otorgados por Dr. Andrés Couve, Universidad de Chile. Para tratamientos de neuronas corticales se utilizaron los siguientes reactivos: Dimetilsulfoxido (DMSO, Calbiochem), Cloroquina (Sigma-Aldrich) y MG-132 (Sigma-Aldrich). Para tinción del citoesqueleto de actina se utiliza Phalloidin 488 y Phalloidin 546 (Cytoskeleton).

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en el presente trabajo se resumen en la Tabla 1. Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP (*horseradish peroxidase*) utilizados son: anti IgG de ratón y conejo (Jackson Laboratories, 1 : 5000), y anticuerpo secundario anti igG de cabra (Santa Cruz, 1 : 2000). Para inmunocitoquímica se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con las sondas fluorescentes Alexa Fluo-488, -543, -633 y -647 (Life Technologies, 1 : 450).

Proteína / epítipo	Código	Empresa	Especie	Concentración de uso	
				ICC	WB
α tubulina	T6199	Sigma	ratón	1 : 1000	1 : 10000
β 3 tubulina (tuj-1)	G712A	Promega	ratón	1 : 1000	-
β galactosidasa	Z3781	Promega	ratón	-	1 : 1000
Bassoon	141021	Synaptic Systems	ratón	-	1 : 1000
FLAG	F18041 (clon M2)	Sigma	ratón	-	1 : 2000
GST	05-782	Millipore (Upstate)	ratón	-	1 : 10000
Homer1	160021	Synaptic Systems	conejo	1 : 1000	1 : 5000
MAP1B total	N19	Santa Cruz	cabra	1 : 200	1 : 1000
MAP1B LC1	H130	Santa Cruz	conejo	1 : 200	1 : 1000
MAP2	AB5622	Millipore	conejo	1 : 500	-
myc	A14	Santa Cruz	conejo	-	1 : 1000
PSD-95	APZ-009	Alomone	conejo	-	1 : 1000
SNAP-25	111002	Synaptic Systems	conejo	1 : 200	1 : 5000
Snapin	148002	Synaptic Systems	conejo	1 : 200	1 : 1000
Synaptophysin I	101011	Synaptic Systems	ratón	1 : 1000	1 : 10000
Synaptotagmin I	105011	Synaptic Systems	ratón	1 : 200	1 : 1000
tau-1	MAB3420	Millipore	ratón	1 : 500	-

Tabla 1. Listado de anticuerpos primarios. ICC: inmunocitoquímica, WB: Western Blot. Se detalla marca, número de catálogo, especie de generación y diluciones para distintos protocolos.

Cultivos celulares

Las líneas celulares N2A y COS7 fueron mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS. Gibco) y una mezcla al 1% de los antibióticos penicilina y streptomina, y del antifúngico anfotericina (Anti-Anti, Gibco). Todos los tipos celulares se mantienen en incubadora a 37°C y 5% CO₂.

Cultivo primario neuronas corticales

Los cultivos primarios de neuronas corticales embrionarias de ratón se realizaron en base a lo descrito en Kaech y Banker, 2006. Brevemente, se eutanasia una hembra preñada MAP1B +/- y se disecta su útero desde donde se aíslan los embriones, a los que se les extraen ambos hemisferios corticales, para posteriormente ser tratados con 0.25% tripsina (Gibco) y con 0.1 gr/ml DNasa I (Roche) durante 30 minutos a 37°C. Los hemisferios corticales provenientes de cada embrión son tratados individualmente con el fin de obtener neuronas de genotipo conocido. Las cortezas son disgregadas sutilmente con pipeta *Pasteur* y son sembradas a una densidad aproximada de 20.000-25.000 células/cm² sobre placas de 60 mm o 100 mm previamente tratadas con poli-L-lisina 1mg/ml (Sigma-Aldrich). Para su adhesión, las células se incuban en medio de plaqueo neuronal (medio MEM suplementado con 10% suero de caballo (*horse serum*, HS. Gibco), 6% glucosa (Sigma-Aldrich) y 1% penicilina, streptomina y anfotericina) durante 90 minutos a 37°C. Luego de esto, el medio es reemplazado por medio de mantención neuronal, compuesto por Neurobasal A (Life Technologies) sin suero, suplementado con B27 (Life Technologies), N2 (Life Technologies), piruvato de sodio (Life

Technologies), GlutamMAX (Life Technologies) y 1% penicilina, streptomycin y anfotericina. Las neuronas se mantienen en incubadora a 37°C y 5% CO₂.

Co-cultivo primario de neuronas hipocampales - astrocitos

Se realizaron co-cultivos de neuronas hipocampales embrionarias (E18.5) de ratón con astrocitos provenientes de ratas neonatas tal como ha sido descrito (Kaech y Banker, 2006). Brevemente, para la obtención de los astrocitos se eutanasiaron 3-4 neonatos de rata P0-P2 y se extraen ambos hemisferios corticales, los que son tratados con 0.25% tripsina y con 0.1 gr/ml DNasa I durante 30 min a 37°C. Posteriormente las cortezas son disgregadas sutilmente con pipeta *Pasteur* y son sembradas sobre placas de 6-multipocillo en medio MEM suplementado con 10% HS y 6% glucosa y 1% penicilina, streptomycin y anfotericina. Para evitar la proliferación de microglías sobre la monocapa de astrocitos, estos son lavados con PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X el día siguiente del cultivo y cada 2 días a partir de ese momento. Entre los días 6-8 post-cultivo, los astrocitos han alcanzado una confluencia aproximada de un 80%. El día previo al cultivo de neuronas hipocampales, los astrocitos son ambientados con medio de mantención neuronal. Para el cultivo de neuronas hipocampales embrionarias de ratón, se eutanasia una hembra preñada MAP1B +/- y se disecta su útero desde donde se aíslan los embriones y se extraen ambos hipocampos, los que son tratados con 0.25% tripsina durante 30 minutos a 37°C. El par de hipocampos provenientes de cada embrión es tratado individualmente con el fin de obtener neuronas de genotipo conocido. Los hipocampos son sutilmente disgregados con pipeta *Pasteur* y son sembrados a una baja densidad (10.000 – 12.000 células/cm²) sobre *coverlips* previamente tratados con poli-L-lisina 1mg/ml que ya poseen los soportes de parafina. Las células se dejan 90 minutos para que se

adhieran al sustrato de los coverslips, en medio de plaqueo neuronal. Luego de esto, los *coverslips* con las células ya adheridas son depositados sobre la monocapa de astrocitos ambientados con medio de mantención neuronal de tal manera que los soportes de parafina queden orientados mirando hacia la base del pocillo, de modo que las neuronas y los astrocitos no queden en contacto físico. La disposición espacial permite un máximo de 4 *coverslips* de 12 mm y 1 *coverslip* de 25 mm por cada pocillo de 35 mm de una placa de 6 pocillos. Al día 3 post-cultivo neuronal, las células son tratadas con 5 μ M AraC (Cytosine β -D-arabinofuranoside, Sigma-Aldrich), para inhibir la proliferación de células no neuronales (astrocitos y microglías principalmente) en los *coverslips* donde se han sembrado las neuronas hipocampales. Cada 3 días se descarta 1/3 del medio de cultivo y se suplementa con medio de mantención neuronal fresco. Las células se mantienen hasta por 21 días *in vitro* (21 DIV) en incubadora a 37°C y 5% CO₂. Protocolo de co-cultivo de neuronas hipocampales y astrocitos se esquematiza en la Figura 4.

Transfección transiente de DNA

Transfecciones transientes de DNA plasmidial se realizaron en líneas celulares y neuronas hipocampales de 10 días *in vitro* (*days in vitro*, DIV) siguiendo el protocolo de transfección con Lipofectamina 2000 (Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, los complejos de DNA plasmidial y Lipofectamina 2000 se forman en medio Opti-MEM (Life Technologies) para posteriormente ser agregados a las células. Para líneas celulares, las transfecciones se realizan durante 6-18 horas en medio de transfección (DMEM sin suero y sin antibiótico). Luego de este tiempo, el medio se reemplaza por el medio

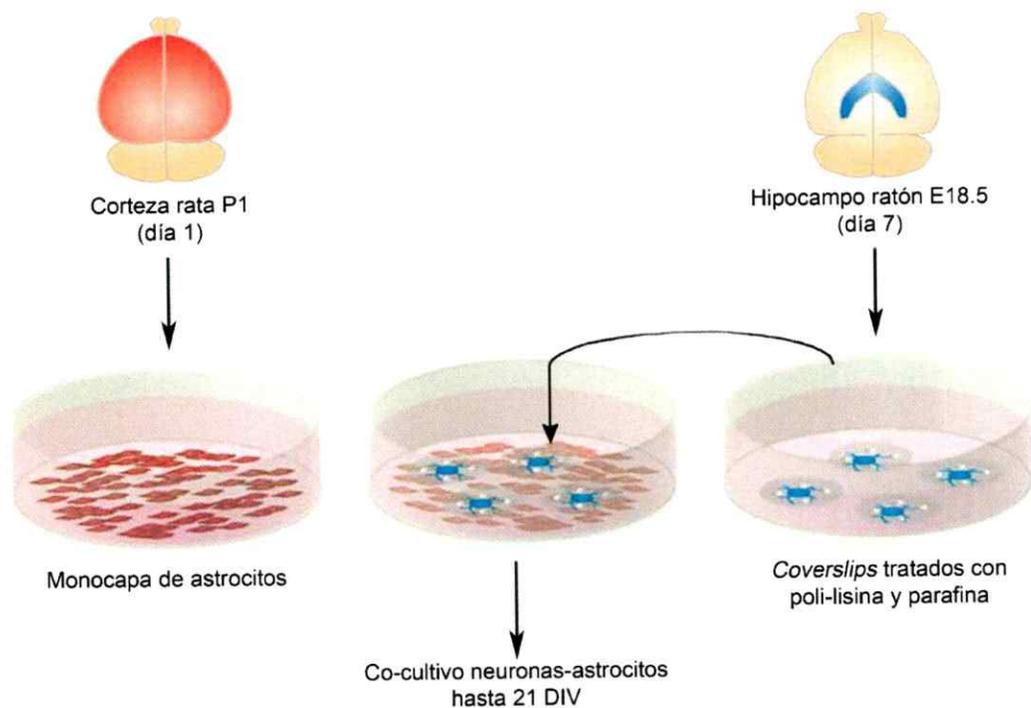


Figura 4. Esquema protocolo co-cultivo neuronas hipocampales-astrocitos. Neuronas embrionarias E18.5 hipocampales de ratón (azul) se mantienen en co-cultivo con astrocitos provenientes de neonatos de rata (día post-natal P0-P1) (rojo) hasta 21 DIV. Luego de este tiempo las neuronas son utilizadas en ensayos de Inmunocitoquímica o microscopía electrónica. Esquema modificado de Kaech y Banker, 2006.

de mantención correspondiente a cada tipo celular. Para placas de 60 mm las transfecciones se llevan a cabo con 4 μg de DNA plasmidial, y para placas de 100 con 8 μg de DNA plasmidial. El volumen de Lipofectamina 2000 se agrega en una proporción 2 : 1 con respecto a la masa de DNA plasmidial utilizado. Para transfección de neuronas hipocampales de 10 DIV el medio en el que se encuentran es removido y almacenado a 37°C. La transfección se realiza durante 2 horas en Neurobasal A fresco. Luego de este tiempo, se vuelve a agregar el medio de mantención

previamente guardado, suplementado con 1/3 de medio de mantención fresco. En placas *multiwell*-24, se agregan 0.5 µg de DNA plasmidial y 0.75 µl de Lipofectamina 2000 por pocillo.

Inmunocitoquímica

Se siguió el mismo protocolo tanto para líneas celulares como para neuronas hipocampales mantenidas distintos períodos *in vitro*. Las células adheridas a los *coverslips* fueron fijadas en una solución de 4% paraformaldehído (PFA, Sigma-Aldrich) y 4% sacarosa (Merk-Millipore) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X y se permeabiliza con una solución de 0.2% Tween-20 (Calbiochem) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego las células son lavadas y bloqueadas con 5% albumina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA, Merk Millipore) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posterior al bloqueo, los *coverslips* se incuban con los anticuerpos primarios en una solución de 1% BSA toda la noche (16 horas) a 4°C. Las células son lavadas y e incubadas con los anticuerpos secundarios acoplados a sondas fluorescentes específicas (ver lista de anticuerpos) y/o Phalloidin 488 / 546, durante 60 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Los *coverslips* son lavados en PBS 1X y ddH₂O para finalmente montarlos sobre portaobjetos en medio de montaje FluorSave (Calbiochem). Las preparaciones resultantes son almacenadas a 4°C protegidas de la luz hasta el momento se análisis en el microscopio confocal.

Inmunoblot (SDS-PAGE)

Muestras de proteínas provenientes de tejido cerebral, neuronas corticales y líneas celulares se obtienen mediante homogenización en buffer de extracción de proteínas RIPA (65 mM Tris, 155 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA pH 7.4, 20

mM PMSF, 5mM NaF, 5 mg/ml Na₃VO₄, *complete protease inhibitory cocktail* 1X (PIC, Roche) y 20 nM caliculina A). El homogenizado se centrifuga a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se rescata la fracción soluble donde se han enriquecido las proteínas. La concentración de las muestras de proteínas es determinada mediante el método de Bradford, utilizando reactivo Bradford (BioRad), y posteriormente estas son denaturadas en *buffer* de carga a 95°C durante 5 minutos. Las muestras con las proteínas ya denaturadas son cargadas en geles de poliacrilamida (Merk-Millipore) y separadas por peso molecular en *buffer* de corrida (25 mM Tris Base, 190 mM glicina, 0.1% SDS). Las proteínas son transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm de diámetro de poro (Thermo Pierce) o membranas de *polyvinylidene fluoride* (PVDF, BioRad) de 0.2 µm de diámetro de poro. Las membranas son bloqueadas con solución de bloqueo (5% leche descremada en buffer TBS 1X (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se incuban en 1% leche descremada en TBS 1X toda la noche (16 horas) a 4°C en agitación. Las membranas son lavadas con 0.05% Tween-20 en TBS 1X para posteriormente incubar los anticuerpos secundarios acoplados a *horseradish peroxidase* (HRP) (Ver lista de anticuerpos) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar, las membranas son reveladas utilizando el reactivo ECL Western Blotting Substrate (Thermo Pierce), y la señal quimio-luminiscente es detectada con películas radiográficas (Fujifilm).

Clonamiento de GST-SNAP25 I y Snapin-BIFC

A partir de cerebro de ratón adulto se extrajo RNA total utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen). El RNA es precipitado con isopropanol (Sigma-Aldrich) y lavado con etanol absoluto (Sigma-Aldrich), para finalmente ser eluído en ddH₂O libre de nucleasas. La reacción

de transcripción reversa se realizó con el kit SuperScript III First Strand Synthesis for RT-PCR (Life technologies) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, la síntesis del cDNA se realiza a partir del mRNA total utilizando partidor oligo-(dT), con la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT, entre 42 y 55°C. El protocolo de PCR se lleva a cabo utilizando la enzima Taq DNA Polymerase (Life technologies). Se generaron los siguientes pares de partidores para la amplificación a partir del cDNA total de cerebro de ratón adulto, donde subrayado se destaca la secuencia correspondiente al sitio de corte de la enzima de restricción indicada entre paréntesis: Forward SNAP-25 5'- ATA CGG ATC CAT GGC CGA AGA C -3' (BamHI), Reverse SNAP-25 5'- ATC GGT CGA CTT AAC CAC TTC CCA G -3' (Sall), Forward Snapin WT 5'- AAT TGG ATC CAT GGC CGC GGC TCG TT - 3' (BamHI), Reverse Snapin WT 5'- CGC CGA ATT CTT TGC TTG GAC AAC C -3' (EcoRI). El protocolo de mutagénesis se siguió como se ha descrito previamente (Ko y Ma, 2005), y la mutación puntual se generó con los siguientes partidores: Forward Snapin C66A 5'- GGG GCT CTT CTG CTC GGA TCA ATG AGG -3' (EalI), Reverse Snapin C66A 5'- GGG GCT CTT CTA GCC AGT TCT GTA GCT AG -3' (EalI). La mutación se comprobó mediante secuenciación del DNA plasmidial. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante (New England Biolabs). Productos de PCR y vectores vacíos (pGEX3.1, NYFP y CYFP) ya digeridos, son purificados desde geles de agarosa usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega). El DNA digerido y purificado es ligado con la enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs), a 4°C durante 18 horas. El producto de ligación es utilizado para transformar bacterias *e. coli* de la cepa DH5 α mediante shock térmico. Clones positivos para la selección con antibiótico son seleccionados y utilizados para amplificar y purificar el DNA plasmidial resultante, utilizando el kit GeneJET Plasmid Midiprep (Thermo Scientific). La

generación del vector GST-SNAP25, su purificación y posterior utilización en ensayos de *pulldown* se muestra en la Figura 5.

Purificación de proteínas recombinantes, ensayos de *Pulldown*

Bacterias *E. coli* de la cepa BL21 son transformadas con los vectores pGEX vacío, pGEX-SNAP25 y pGEX-LC1 que codifican para GST, GST-SNAP25 y GST-LC1 respectivamente. Se induce la expresión de las proteínas de fusión con 2 mM IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) (US Biological) a 37°C durante 2 horas en agitación. Posteriormente las bacterias se resuspenden en *buffer* de solubilización (50 mM de Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 25mM NaF, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 y *protease inhibitory cocktail* 1X) y son lisadas mediante sonicación (5 pulsos de 15 segundos a 30% de potencia con intervalos de 60 segundos entre cada pulso). La fracción soluble del lisado bacteriano se incuba con la resina glutatión-sefarosa (GE Healthcare). Los ensayos de *pulldown* se realizan a partir 500 – 1500 μ g de proteínas totales incubadas con 20 – 50 μ l de resina, toda la noche (16 horas) a 4°C en agitación. Luego la resina es lavada con *buffer* de solubilización y las proteínas son denaturadas para realizar SDS-PAGE.

Inmunoprecipitación

Extracto protéico cerebral crudo (1 mg) se incuba con 2 μ g de anticuerpo específico en *buffer* de solubilización, a 4°C en agitación durante 16 horas. Posteriormente el extracto junto con el anticuerpo se incuba con A/G Protein-Sepharose (Sigma-Aldrich), a 4°C en agitación durante 4 horas. La solución es centrifugada (500 g, 60 segundos) y se recupera la resina, la que es lavada de 4 a 6 veces con *buffer* de solubilización. La resina y las proteínas que interactúan con ella son denaturadas para realizar SDS-PAGE.

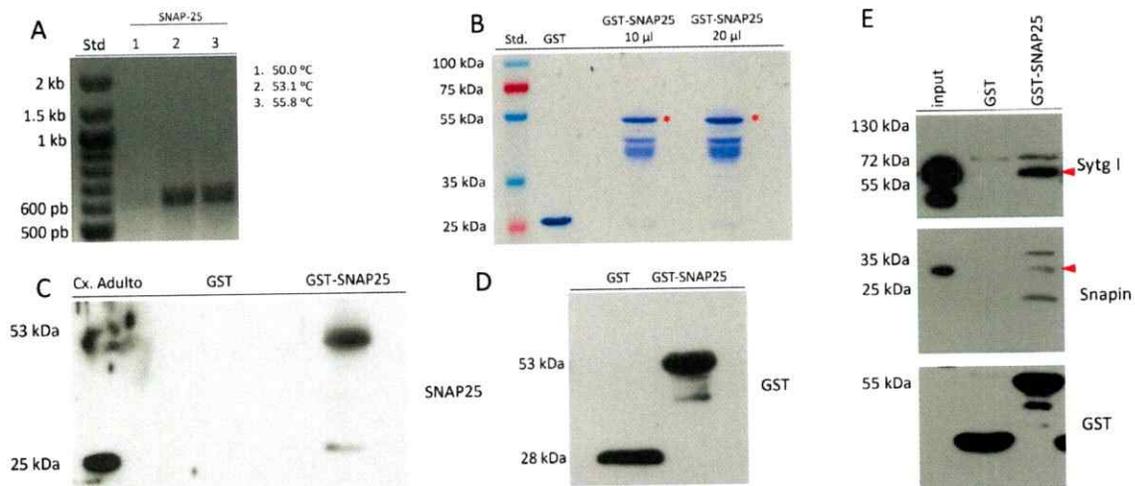


Figura 5. Clonamiento de la proteína de fusión GST-SNAP-25. (A) PCR a partir de cDNA de cerebro de ratón adulto donde se observa el amplificado obtenido para la secuencia de SNAP-25 (632 pb). Cada reacción de amplificación se realizó a las temperaturas de *annealing* 50.0°C, 53.1°C y 55.8°C. (B) Tinción de azul de Coomassie donde se observa las proteínas purificadas GST (28 kDa) y GST-SNAP-25 (53 kDa). Esta última corresponde a la banda señalada con asteriscos rojos. (C) *Immunoblot* con anticuerpo contra SNAP-25, donde se utiliza como control positivo 30 µg totales de extracto proteico de corteza de ratón adulto. (D) *Immunoblot* con anticuerpo contra proteína GST. 10 µl por carril para cada proteína purificada. (E) *Pulldown* con la proteína GST-SNAP-25 contra extracto de corteza de ratón adulto, revelado contra las proteínas Synaptotagmin I y Snapin (cabezas de flecha rojas). Se aprecia que durante etapas adultas ambas proteínas interactúan específicamente con SNAP-25 y no así con GST. *Input* corresponde a 3% de carga respecto a ensayos de *pulldown*.

Microscopía electrónica

El protocolo de microscopía electrónica se llevó a cabo como ha sido descrito previamente (Barrientos y col., 2011). Neuronas hipocampales embrionarias WT y MAP1B ^{-/-} son sembradas sobre *coverslips* plásticos de acetato de celulosa 22 x 22 mm (Electron Microscopy Science) previamente tratados con poli-L-lisina 1mg/ml y que poseen soportes de parafina. Las neuronas son mantenidas 21 días *in vitro* (*days in vitro*, DIV) en co-cultivo con

astrocitos, momento en el que son fijadas con una solución 2.5% glutaraldehído, 0.01% ácido pícrico, 0.1 M *buffer* cacodilato pH 7.4. Posteriormente las neuronas son incubadas en 1% OsO₄ por 1 hora y luego en 2% acetato de uranilo por 2 horas. Las muestras son deshidratadas con etanol y óxido de propileno e infiltradas con resina Epon. Secciones ultrafinas son contrastadas con 1% acetato de uranilo. Las rejillas fueron examinadas en el microscopio electrónico Philips Tecnai 12 operado a 80 kV. Se obtuvieron películas que fueron escaneadas y posteriormente analizadas utilizando el programa ImageJ.

Protocolo de reconstrucción basado en programa Imaris (Bitplane)

Se estandarizaron parámetros de adquisición de imágenes para generar 2 tipos de reconstrucciones tridimensionales con el programa Imaris, basándose en protocolo descrito previamente (Schatzle P y col., 2012) (Figura 6). El primer conjunto de imágenes se adquirió con el propósito de generar reconstrucciones de filamentos dendríticos positivos para el marcador MAP2 y reconstrucciones de puntos positivos para el marcador presináptico Synaptophysin I. El segundo conjunto fue adquirido para generar reconstrucciones de puntos del marcador presináptico Synaptophysin I y el marcador postsináptico Homer 1. En términos generales, muestras de inmunocitoquímica de neuronas de 21 DIV tanto WT como MAP1B ^{-/-} son analizadas mediante microscopía confocal. Para las reconstrucciones de filamentos dendríticos y puntos presinápticos se adquirieron imágenes en microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta, mientras que para las reconstrucciones de puntos presinápticos y postsinápticos se adquirieron imágenes en el microscopio confocal Zeiss LSM 710. Las imágenes en formato *z-stacks* para ambos grupos de reconstrucciones fueron adquiridas con objetivo de Plan-Apochromat 63x/1.4

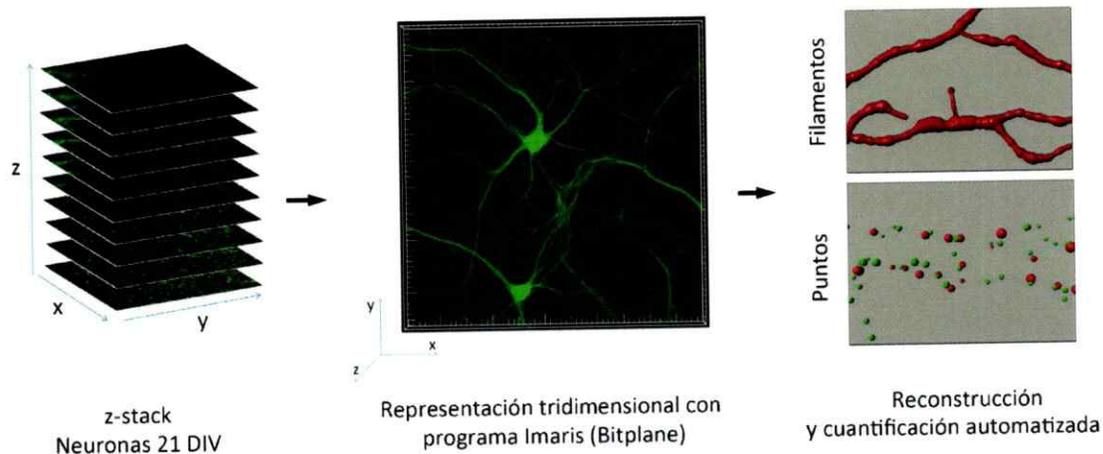


Figura 6. Protocolo de generación de reconstrucciones utilizando el programa Imaris. Imágenes de inmunocitoquímica de neuronas WT y MAP1B $-/-$ de 21 DIV son adquiridas en formato de *z-stack*, para que posteriormente Imaris genere reconstrucciones tridimensionales de filamentos MAP2 positivos y puntos Synaptophysin I positivos (rojo) y Homer 1 positivos (verde).

a una resolución de 1024 x 1024 píxeles. Para las reconstrucciones de filamentos el tamaño de las imágenes en el eje xy es de $91.405 \mu\text{m}^2$, mientras que para las reconstrucciones de puntos sinápticos, el tamaño de las imágenes en el eje xy es de $103.14 \mu\text{m}^2$. Los valores de intensidad de láser, ganancia del detector y velocidad de escaneo se mantienen invariables para cada conjunto de imágenes adquiridas. Para las reconstrucciones de filamentos dendríticos, La señal de Synaptophysin I se encuentra acoplada al anticuerpo secundario anti-*mouse* Alexa Fluor-488. La señal de MAP2 se encuentra acoplada al anticuerpo secundario anti-*rabbit* Alexa Fluor-543. Para las reconstrucciones de puntos sinápticos, la señal de Homer 1 se encuentra acoplada al anticuerpo secundario anti-*rabbit* Alexa Fluor-488. La señal de Synaptophysin I se encuentra acoplada al anticuerpo secundario anti-*mouse* Alexa Fluor-543. Los *z-stacks* obtenidos son posteriormente analizados en su formato .ism con el programa Imaris (Bitplane). Para las

reconstrucciones de filamentos dendríticos se sigue la secuencia *Surpass > Add new Filament*, donde se escogió el algoritmo *Autopath (no loops)* en conjunto con la opción *Calculate Diameter of Filaments from Image*. Para las reconstrucciones de puntos se sigue la secuencia *Surpass > Add new Spots*, en donde dos sub conjuntos de estas estructuras son generadas. En la primera se generan puntos de diámetro constante y en la segunda se generan puntos de diámetro variable que dependen del área en que la intensidad de fluorescencia de la señal es comparativamente mayor a la fluorescencia *background* promedio de la imagen, con la herramienta *Different Spots Sizes (Region Growing)* (Figura 7). Para determinar la proporción de puntos presinápticos que se encuentran en la proximidad de un proceso dendrítico se utiliza el *plugin* basado en *Mathlab*, *Find Spots Close to Filaments*. Para determinar la proporción de puntos presinápticos y postsinápticos que colocalizan se utiliza el *plugin* basado en *Mathlab*, *Colocalize Spots*. Datos crudos de las distintas cuantificaciones automatizadas llevadas a cabo por el programa son exportados a planillas *Excel* para su posterior análisis estadístico.

Protocolo de reconstrucción basado en programa ImageJ

Los parámetros de adquisición de imágenes, como también las tinciones utilizadas en cada conjunto de ensayo de inmunocitoquímica son idénticos a lo descrito en la sección anterior. Imágenes en formato *.ism* son analizadas utilizando *ImageJ* a través de su *plugin* *Fiji ImageJ*. Para el análisis de terminales presinápticos positivos para *Synaptophysin I* y dendritas positivas para *MAP2*, se realiza proyección de máxima intensidad de fluorescencia a partir de *z-stack*. Se genera máscara binaria del canal de *Synaptophysin I*, con la herramienta *Adjust Treshold*. Las estructuras generadas se seleccionan con la herramienta *Analyze Particles*. Máscara binaria del canal de *MAP2* se expande utilizando el filtro *Maximum* para determinar

región de contacto con terminales presinápticos. Imágenes son fusionadas a través de la herramienta *Image Calculator > Multiply*. Número de terminales presinápticos y propiedades intrínsecas de estos son obtenidos en forma automatizada. Para análisis de colocalización de terminales pre y postsinápticos, se realiza proyección de máxima intensidad de fluorescencia a partir de *z-stack*. Se genera máscara binaria del canal de Synaptophysin I y del canal de Homer 1, con la herramienta *Adjust Treshold*. Análisis de colocalización se lleva a cabo con el *plugin Puncta Analyzer* tal como se ha descrito en la literatura (Christopherson y col., 2005). Número de puntos totales y porcentaje de colocalización son obtenidos de forma automatizada.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se desarrollaron utilizando el programa Graphpad Prism 5. Los gráficos representan promedio \pm error estándar, y los histogramas de frecuencias relativas y acumuladas son generados en base a intervalos de valores. Comparaciones entre dos grupos de datos se llevó a cabo mediante *test* de Student no pareado de dos colas, donde el nivel mínimo de significancia considerado es de $p < 0.05$. Comparación entre más de dos grupos de datos se llevó a cabo mediante ANOVA de una vía con post-test de Bonferroni, donde el nivel mínimo de significancia considerado es de $p < 0.05$.

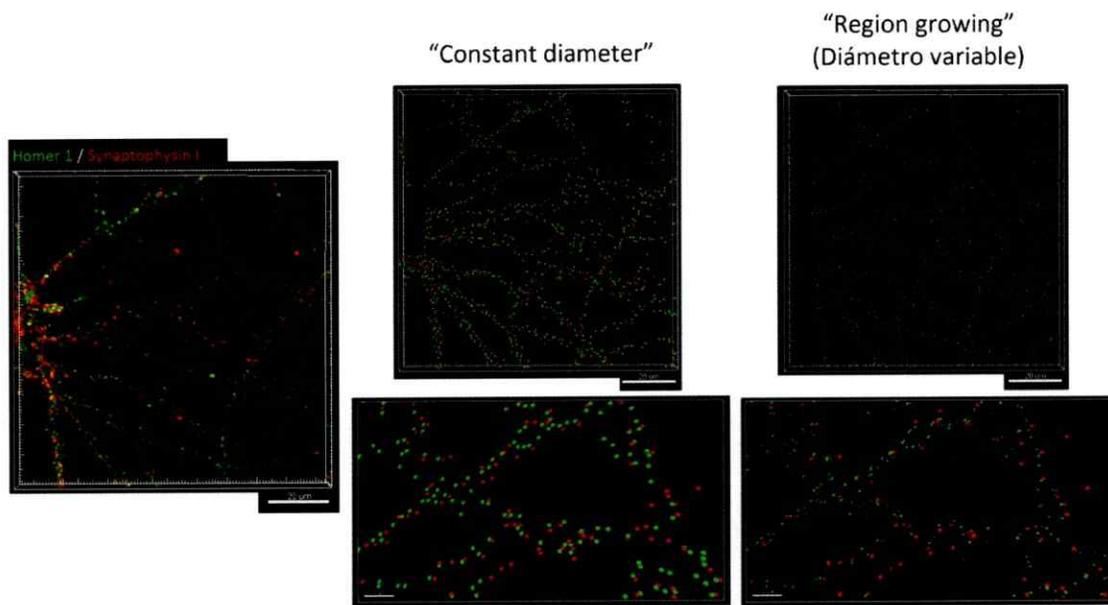


Figura 7. Protocolos de reconstrucción de puntos sinápticos. En el panel de la izquierda se muestra una representación tridimensional de un conjunto de imágenes crudas adquiridas en formato *z-stack*, correspondiente a cultivo de neuronas hipocámpales WT de 21 DIV. Se generan dos tipos de reconstrucciones de puntos o “*spots*” a partir de las señales pre y postsinápticas. El primer tipo de reconstrucción se muestra en el panel central y recibe el nombre “*constant diameter*”. Con este protocolo se generan puntos de diámetro previamente establecido, el cual ha sido fijado en forma arbitraria y que no varía dependiendo de las características individuales de cada *cluster* protéico detectado. Como ejemplo se utiliza una reconstrucción de puntos presinápticos y postsinápticos de 1 μm de diámetro constante. El segundo protocolo, que se muestra en el panel de la derecha, recibe el nombre de “*region growing*” y se caracteriza por definir puntos de diámetro variable en función del área en que la intensidad de fluorescencia de la señal es comparativamente mayor a la fluorescencia *background* promedio de la imagen. Puntos rojos positivos para Synaptophysin I, puntos verdes positivos para Homer 1. Barra de tamaño paneles superiores 20 μm . Barra de tamaño *inset* 5 μm

RESULTADOS

Determinación morfológica de compartimentos subcelulares en neuronas maduras

En la Figura 8 se observa una imagen representativa de un cultivo de neuronas WT de 21 DIV, donde se distingue en la región central un soma neuronal de aproximadamente 20 μm de diámetro, del cual se prolongan ramificaciones de distintos tamaños. Aquellas prolongaciones de grueso calibre y positivas para el marcador somato-dendrítico MAP2, serán consideradas como dendritas (flechas blancas en *inset*). Se observan también ramificaciones que forman un entramado sobre el sustrato de adhesión. Estas prolongaciones de pequeño calibre y negativas para MAP2, serán consideradas axones (puntas de flecha blancas en *inset*). Cabe destacar que el entramado de axones que se genera está conformado por prolongaciones provenientes de múltiples neuronas, incluyendo neuronas cuyos somas no son observados en este campo visual particular.

La expresión de MAP1B persiste durante etapas adultas.

MAP1B se expresa en neuronas maduras *in vitro*, donde localiza específicamente en espinas dendríticas (Tortosa y col., 2011). Siguiendo nuestro paradigma experimental, la expresión de MAP1B fue detectada en prolongaciones de diámetro mayor que corresponden a procesos dendríticos, como también en prolongaciones de pequeño calibre correspondientes a axones (Figura 9A). En forma complementaria MAP1B co-distribuye con el marcador somato dendrítico MAP2 y con el marcador axonal tau-1 (Figura 9B), a partir de los que se concluye que

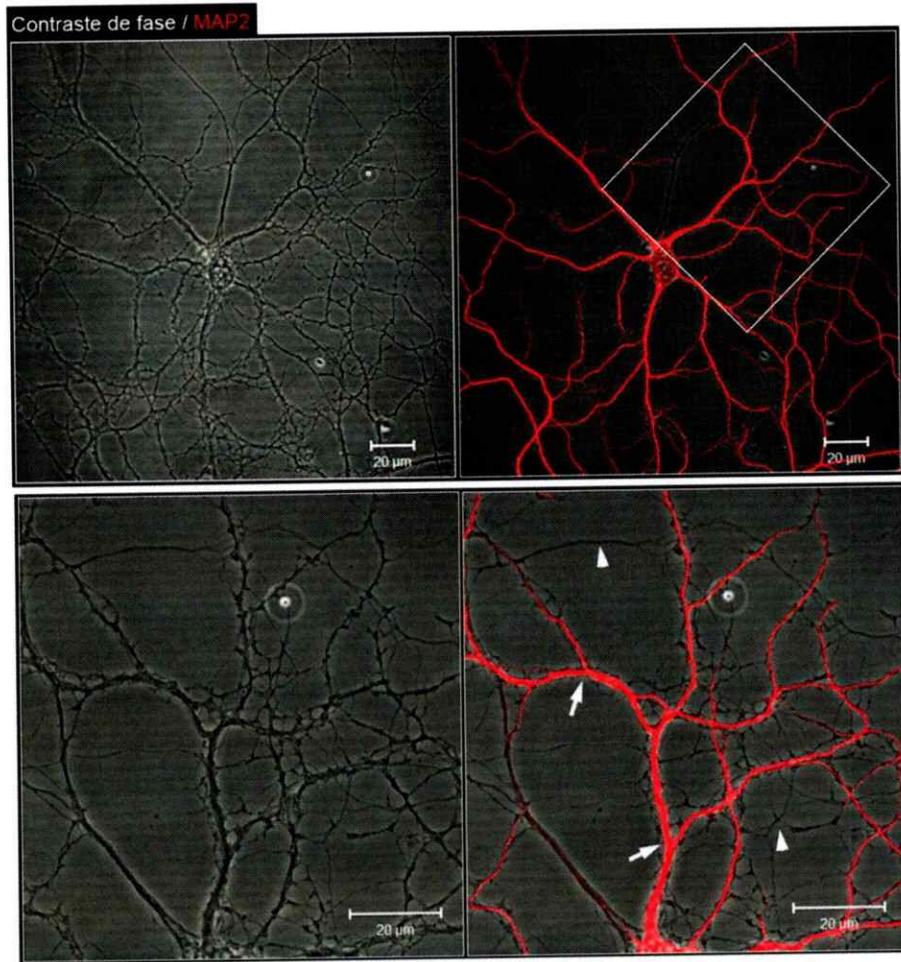


Figura 8. Determinación morfológica de compartimentos subcelulares en neuronas maduras. Inmunocitoquímica de neuronas WT 21 DIV, donde se observa una neurona representativa en contraste de fase más la señal para la proteína MAP2. El panel inferior corresponde al *inset* demarcado en el panel superior, donde con flecha blancas se muestran dendritas, y con cabezas de flecha blancas se indican axones.

MAP1B se expresa tanto en dendritas como en axones en neuronas maduras. *Inmunoblots* muestran que tanto MAP1B total como su cadena liviana LC1 se expresan en distintas regiones de cerebro de ratón adulto, como por ejemplo el bulbo olfatorio, el cerebelo, la corteza y el hipocampo (Figura 9C).

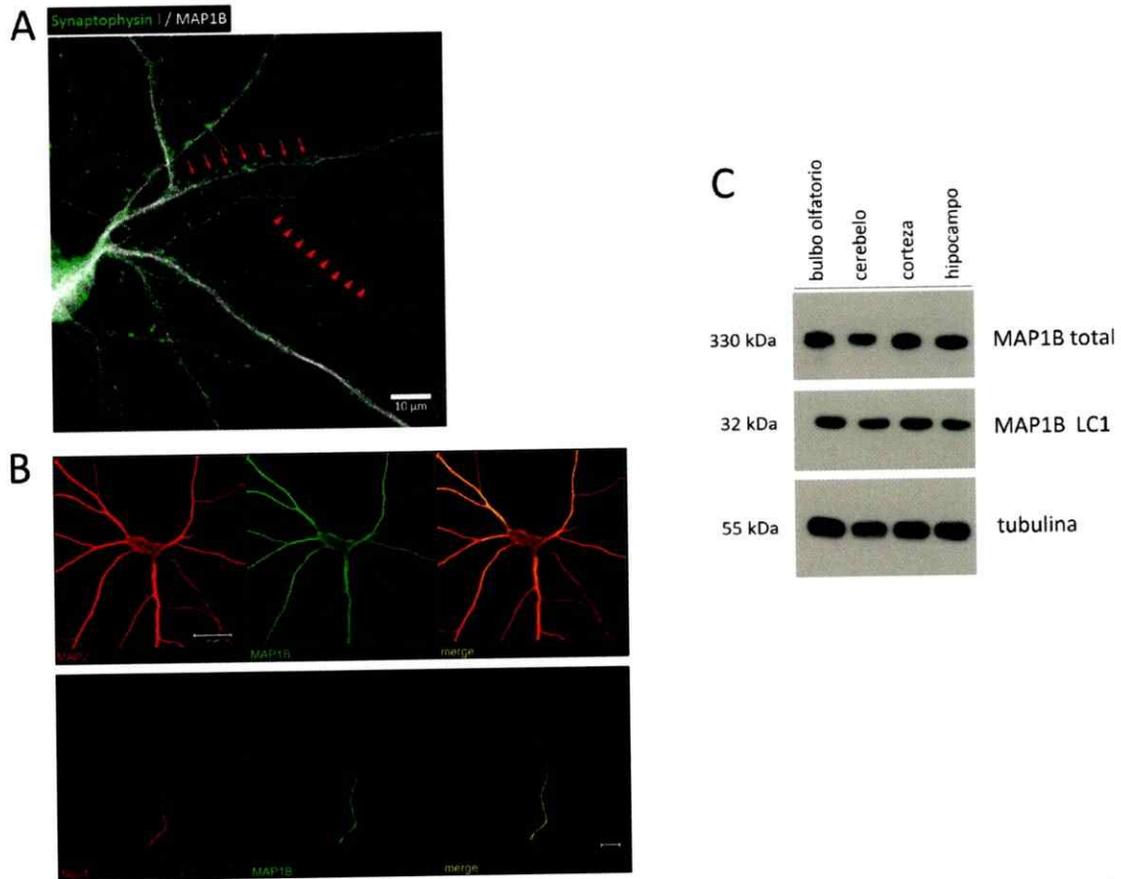


Figura 9. MAP1B se expresa en neuronas maduras y en cerebro adulto. (A) Inmunocitoquímica sobre neuronas WT 21 DIV, donde en verde se observa la señal de Synaptophysin I y en blanco la señal de MAP1B. Con las cabezas de flecha rojas se indica un axón, y con las flechas rojas se indica una dendrita. **(B)** inmunocitoquímica sobre neuronas WT 21 DIV. En el panel superior se muestra en rojo la marca de MAP2 y en verde de MAP1B. En el panel inferior la señal roja corresponde a tau-1, y la verde a MAP1B. **(C)** *Inmunoblots* representativos a partir de distintas regiones de cerebro de ratón adulto, revelado contra MAP1B total, MAP1B LC1 y tubulina. En cada carril se cargaron 30 µg totales de proteína.

Análisis de la abundancia relativa de proteínas sinápticas en extractos de proteínas derivados de cerebros de animales WT y MAP1B -/-.

Extractos protéicos derivados de cerebros enteros de animales WT, MAP1B +/- y MAP1B -/- en etapa embrionaria E18.5 fueron analizados mediante *Western Blot* con el propósito de estimar la abundancia relativa de diversas proteínas sinápticas en los distintos genotipos. Se observa una expresión robusta de MAP1B total en etapas embrionarias en tejido proveniente de animales WT. Los niveles de MAP1B disminuyen de una forma dosis-dependiente en animales tanto MAP1B +/- como MAP1B -/- (Figura 10). No existen variaciones entre los distintos genotipos en la masa de las proteínas presinápticas Bassoon, Synaptotagmin I, Synaptophysin I y SNAP-25, como tampoco de la proteína post-sináptica Homer 1 (Figura 10). Cabe destacar que independiente del genotipo, la señal de la proteína postsináptica PSD-95 no fue detectada en tejido cerebral de animales en etapa embrionaria. Al analizar la masa de proteínas sinápticas a partir de extractos protéicos provenientes de cultivo de neuronas corticales mantenidas 13 DIV, se aprecia que no hay variaciones entre neuronas WT y MAP1B -/- en la masa de las proteínas presinápticas Bassoon, Synaptotagmin I, Synaptophysin I y SNAP-25, como tampoco de las proteínas postsinápticas Homer 1 y PSD-95 (Figura 11). En adición se observa señal de MAP1B en etapas adultas en neuronas corticales WT, concordante con la persistencia en la expresión de MAP1B descrita anteriormente.

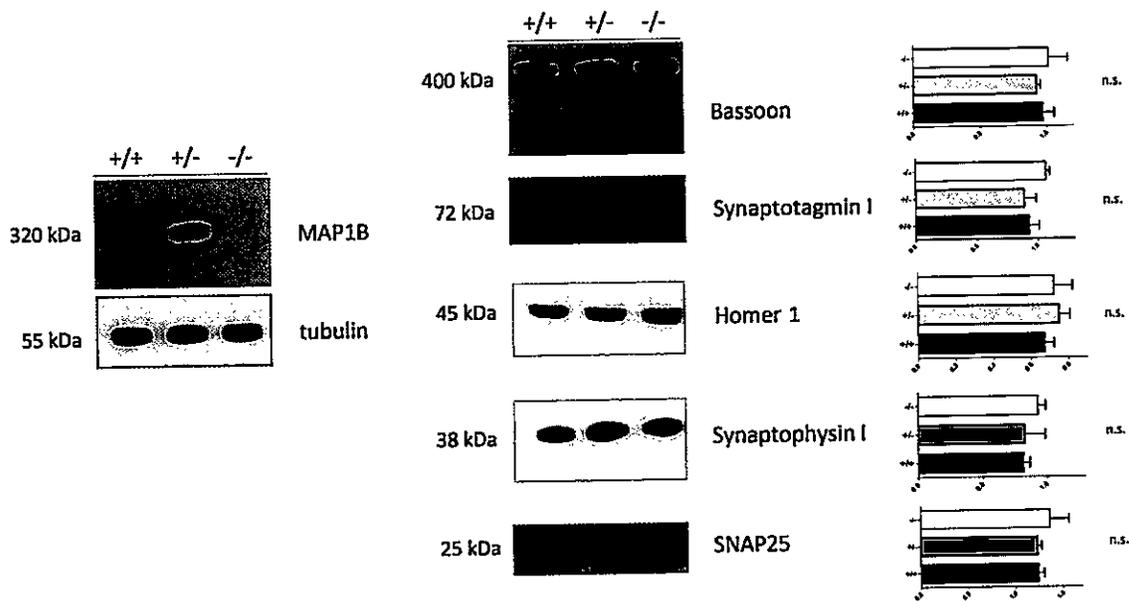


Figura 10. Los niveles de expresión de distintas proteínas sinápticas no varían entre genotipos en etapas embrionarias. *Immunoblots* a partir de cerebro total de animales WT, MAP1B +/- y MAP1B -/- en etapa embrionaria E18.5, utilizando anticuerpos contra distintas proteínas presinápticas y postsináptica. Cada carril se carga con 30 µg de proteínas totales. Niveles de proteínas son estandarizados utilizando α-tubulina como control de carga. Bassoon WT 0.97 ± 0.084 , MAP1B +/- 0.92 ± 0.026 , MAP1B -/- 1.02 ± 0.14 . Synaptotagmin I WT 0.93 ± 0.080 , MAP1B +/- 0.89 ± 0.095 , MAP1B -/- 1.07 ± 0.030 . Homer 1 WT 0.67 ± 0.050 , MAP1B +/- 0.75 ± 0.057 , MAP1B -/- 0.72 ± 0.10 . Synaptophysin I WT 0.82 ± 0.052 , MAP1B +/- 0.83 ± 0.16 , MAP1B -/- 0.93 ± 0.060 . SNAP-25 WT 1.24 ± 0.059 , MAP1B +/- 1.23 ± 0.044 , MAP1B -/- 1.36 ± 0.21 . Todos los valores corresponden a unidades arbitrarias, n=3 para cada condición. ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, no existen diferencias significativas entre ninguno de los grupos analizados.

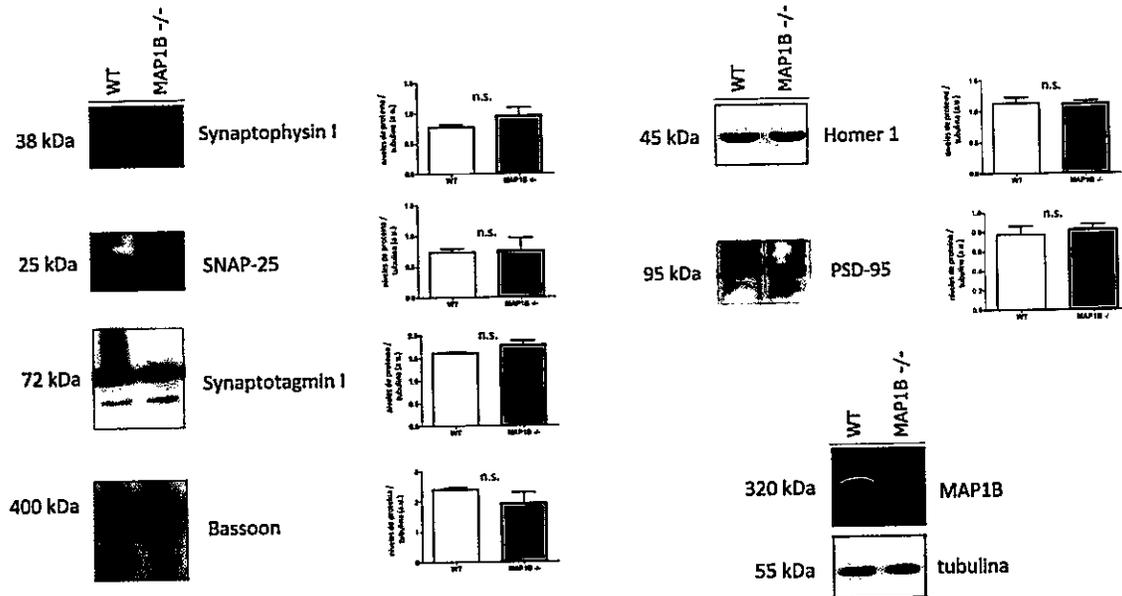


Figura 11. Los niveles de expresión de distintas proteínas sinápticas no varían en neuronas corticales 13 DIV de distintos genotipos. *Immunoblots* a partir de extractos proteínas de cultivo de neuronas corticales mantenidas 13 DIV provenientes de animales WT y MAP1B^{-/-}, utilizando anticuerpos contra distintas proteínas presinápticas y postsinápticas. Cada carril se carga con 30 µg de proteínas totales. Niveles de proteínas son estandarizados utilizando α-tubulina como control de carga. Bassoon WT 2.39 ± 0.066, MAP1B^{-/-} 1.94 ± 0.36. Synaptotagmin I WT 1.61 ± 0.018, MAP1B^{-/-} 1.78 ± 0.092. SNAP-25 WT 0.73 ± 0.056, MAP1B^{-/-} 0.76 ± 0.21. Synaptophysin I WT 0.77 ± 0.040, MAP1B^{-/-} 0.95 ± 0.14. PSD-95 WT 0.78 ± 0.085, MAP1B^{-/-} 0.83 ± 0.057. Homer 1 WT 1.13 ± 0.098, MAP1B^{-/-} 1.13 ± 0.045. Todos los valores corresponden a unidades arbitrarias. n=3 para cada condición, t-test diferencias no son significativas entre ninguno de los grupos analizados.

Neuronas MAP1B $-/-$ presentan un aumento en la proporción de terminales presinápticos deslocalizados

Como aproximación para analizar la densidad y distribución de terminales presinápticos mediante ensayos de inmunocitoquímica en neuronas maduras, se decidió utilizar a la proteína Synaptophysin I como marcador de botones presinápticos. Synaptophysin I se considera en la literatura como un marcador presináptico *bona fide*, capaz de formar contactos sinápticos maduros con una contraparte postsináptica (Wang y col., 2005; Kondo y col., 2012). Neuronas maduras de 21 DIV tanto WT como MAP1B $-/-$ expresan el marcador presináptico Synaptophysin I, que presenta un patrón de expresión espacial punteado en contacto directo con prolongaciones dendríticas MAP2 positivas (Figura 12A). Cada uno de los puntos positivos para Synaptophysin I se considera como un botón presináptico cargado con vesículas sinápticas que potencialmente puede generar sinapsis. En adición al patrón de expresión característico ya descrito, se observa que tanto en neuronas WT como MAP1B $-/-$ existe un porcentaje de puntos presinápticos que no se encuentran en contacto con contrapartes post-sinápticas en dendritas, que son indicados mediante cabezas de flecha en los *inset* del Figura 12A. La localización de los terminales presinápticos positivos para Synaptophysin I es exclusivamente axonal, por ende los botones presinápticos emergen desde un axón que se ubica lo suficientemente cerca de una dendrita como para generar un contacto sináptico. Aquellos puntos presinápticos deslocalizados también se encuentran en procesos axonales sin contra parte dendrítica, tal como queda en evidencia al observar la distribución de la señal de Synaptophysin I sobre procesos axonales determinados mediante contraste de fase, lo que se indica en la Figura 12B mediante flechas en neuronas maduras de ambos genotipos. Se ha

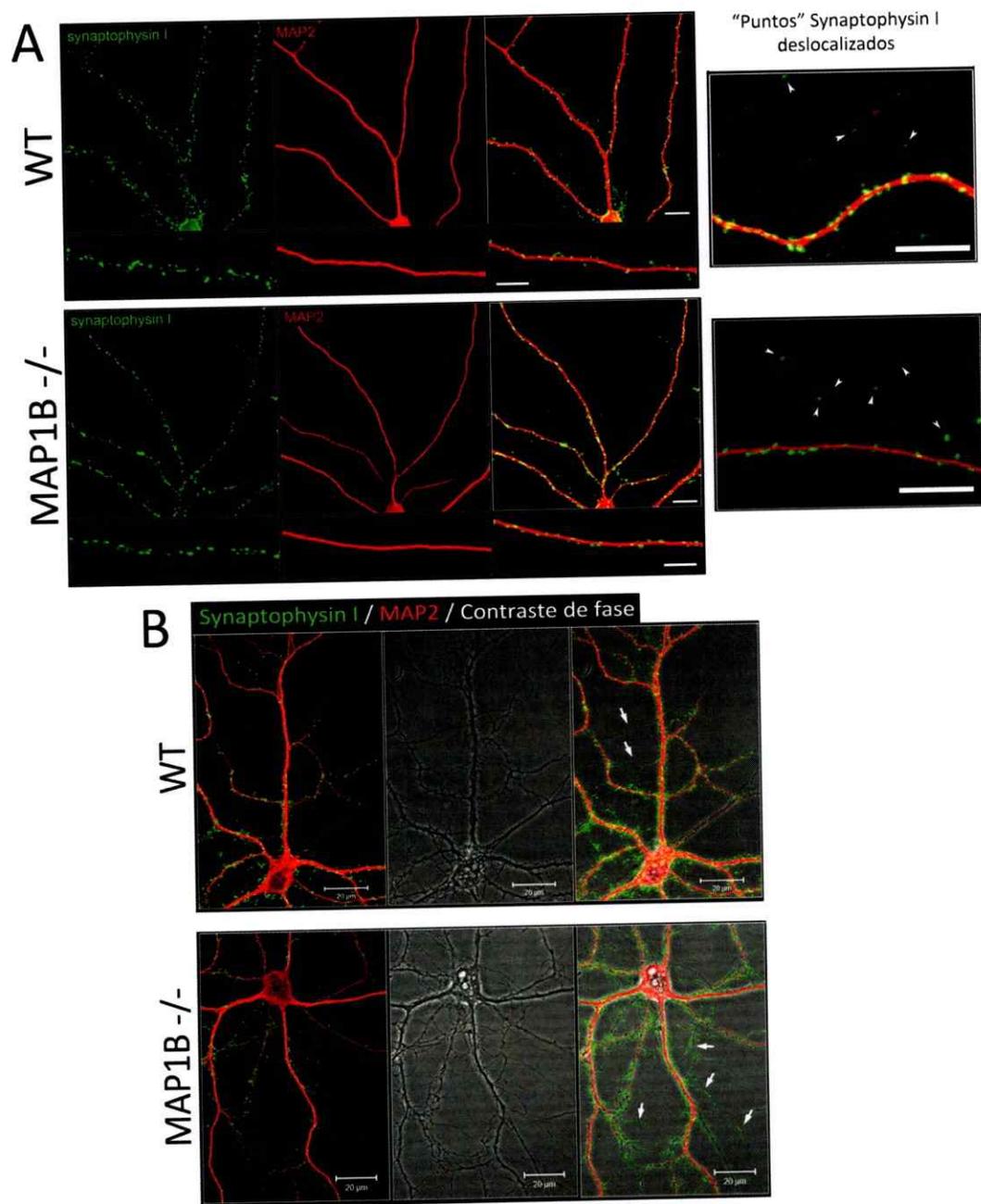


Figura 12. Neuronas maduras WT y MAP1B $-/-$ expresan el marcador presináptico Synaptophysin I. Inmunocytoquímica de neuronas WT y MAP1B $-/-$ de 21 DIV marcadas contra Synaptophysin (verde) y MAP2 (rojo). **(A)** Synaptophysin I presenta un patrón punteado sobre dendritas MAP2 positivas. Existe un porcentaje de puntos deslocalizados en neuronas de ambos genotipos (cabezas de flecha, *inset*). Barra de tamaño 10 μm , *inset* 5 μm . **(B)** Botones Synaptophysin I positivos forman parte de prolongaciones axonales determinados mediante contraste de fase (flechas). Barra de tamaño 20 μm .

descrito que en cultivo de neuronas hipocampales existe un porcentaje de botones presinápticos que se encuentra alejados de dendritas y que no poseen una contraparte postsináptica, los que reciben el nombre de terminales presinápticos huérfanos, que corresponden a paquetes de componentes presinápticos previamente ensamblados, compuestos principalmente de proteínas de la zona activa y por un *cluster* de vesículas sinápticas, que son funcionales desde un punto de vista de la neurosecreción y que son capaces de generar contactos sinápticos maduros (Krueger y col., 2003; Yamada y col., 2013). Considerando este antecedentes se puede sugerir que los botones presinápticos deslocalizados observados en los cultivos maduros podrían corresponder a terminales presinápticos huérfanos. Cualitativamente se observa un mayor número de estos terminales huérfanos en neuronas MAP1B *-/-* en comparación a neuronas WT (Figura 12A y 12 B *inset*). Con el propósito de transformar esta observación cualitativa en un análisis cuantitativo, utilizamos un método de detección y cuantificación de terminales presinápticos semi-automatizado, a través de la generación de reconstrucciones tridimensionales de neuronas maduras con el programa Imaris. Los parámetros y las características de adquisición de las imágenes para la generación de las reconstrucciones son detallados en la sección de materiales y métodos. Las imágenes crudas de inmunocitoquímica de neuronas maduras WT y MAP1B *-/-* son analizadas por Imaris como una representación tridimensional de las neuronas que forman parte del campo visual particular (Figuras 13A y 13C), y es a partir de esta representación que se generan reconstrucciones de filamentos y puntos para neuronas de ambos genotipos (Figura 13B y 13D). En estas reconstrucciones los filamentos rojos corresponden a prolongaciones dendríticas, los puntos verdes corresponden a terminales presinápticos adyacentes a dendritas, y los puntos blancos, a

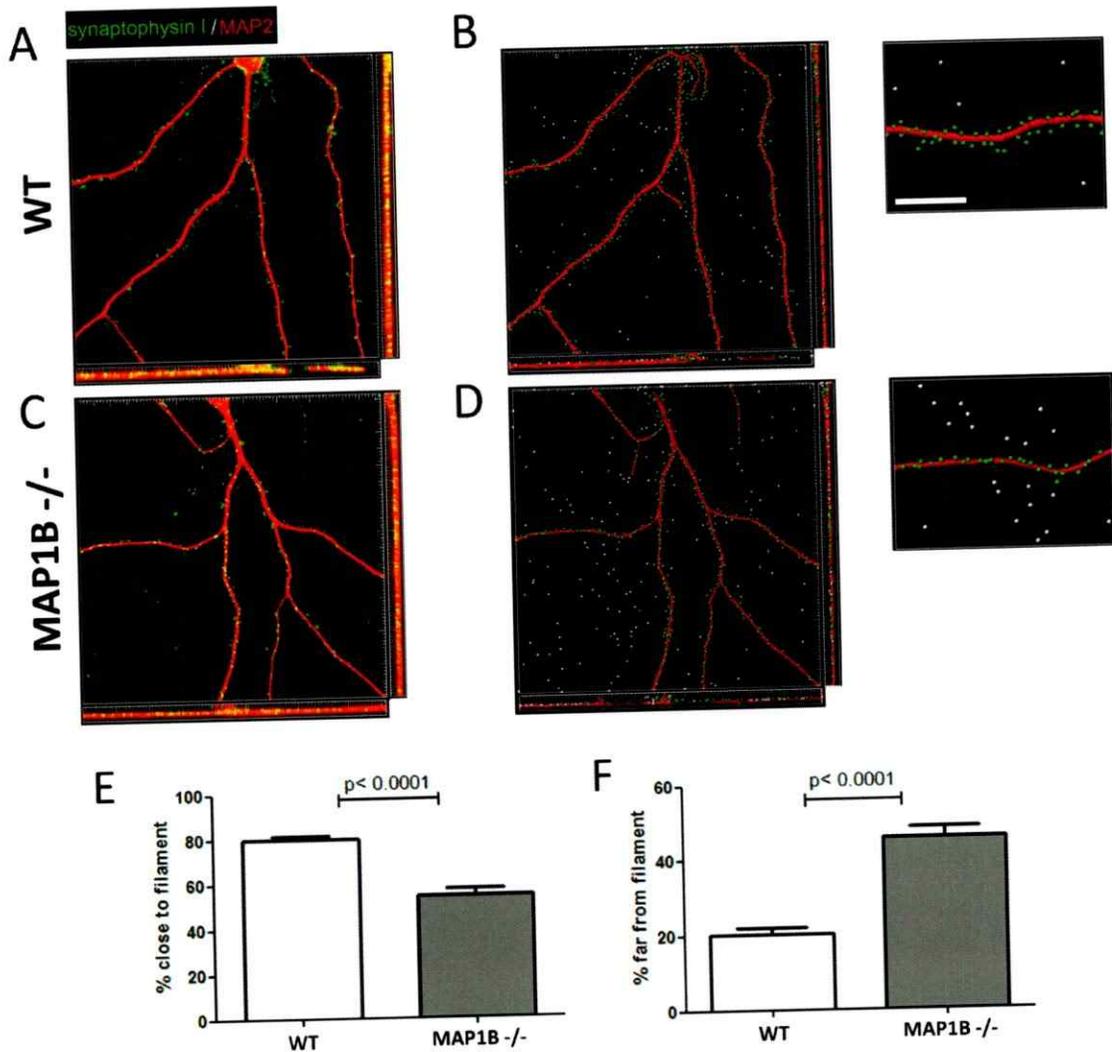


Figura 13. Neuronas MAP1B -/- presentan un aumento en la proporción de terminales presinápticos deslocalizados. Imágenes crudas representativas de *z-stacks* correspondientes a inmunocitoquímica sobre neuronas de 21 DIV WT (**A**) y MAP1B -/- (**C**). Reconstrucciones en tres dimensiones generadas con Imaris para neuronas de 21 DIV WT (**B**) y MAP1B -/- (**D**), donde filamentos rojos corresponden a dendritas positivas para MAP2; puntos verdes, a terminales presinápticos adyacentes de dendritas y puntos blancos, a terminales presinápticos deslocalizados, que no forman contacto con dendritas. (**E**) Cuantificación automatizada de la proporción de terminales presinápticos adyacentes a dendritas. Neuronas WT 21 DIV 79.70% ± 1.73% (n=11 reconstrucciones); neuronas 21 DIV MAP1B -/- 54.28% ± 2.87% (n=11 reconstrucciones). (**F**) Cuantificación automatizada de la proporción de terminales presinápticos deslocalizados, alejados de dendritas. Neuronas WT 21 DIV 20.30% ± 1.73% (n=11 reconstrucciones); neuronas 21 DIV MAP1B -/- 45.72% ± 2.87% (n=11 reconstrucciones). Tamaño celda 5 μ m, barra de tamaño *insets* 10 μ m.

terminales presinápticos deslocalizados o huérfanos. Con el protocolo de reconstrucción se replica la observación del aumento en la proporción de terminales presinápticos huérfanos en neuronas MAP1B $-/-$ en comparación a neuronas WT (*Inset* Figuras 13B y 13D). La cuantificación automatizada llevada a cabo por Imaris da cuenta del aumento de terminales presinápticos huérfanos en neuronas MAP1B $-/-$, donde la proporción de puntos presinápticos en contacto con dendritas pasa de un $79.70\% \pm 1.73\%$ en neuronas WT a un $54.28\% \pm 2.87\%$ en neuronas MAP1B $-/-$ (Figura 13E). En forma consecuente, la proporción de puntos presinápticos alejados de dendritas aumento desde un $20.30\% \pm 1.73\%$ en neuronas WT a un $45.72\% \pm 2.87\%$ en neuronas MAP1B $-/-$. Cabe destacar que esta deslocalización de los botones presinápticos positivos para la proteína Synaptophysin I no tiene correlación con variaciones en los niveles de expresión de esta proteína, tal como se determinó mediante *Immunoblot* en etapas embrionarias y en cultivo de neuronas corticales maduras, donde no existen diferencias en la masa de Synaptophysin I entre los contextos genéticos WT y deficiente para MAP1B (Figura 10 y Figura 11).

Neuronas MAP1B deficientes presentan una reducción en la cantidad de contactos sinápticos

Una vez que se ha determinado la existencia de botones presinápticos huérfanos en neuronas maduras tanto WT como MAP1B $-/-$, queda por analizar si los terminales presinápticos que se encuentran adyacentes a dendritas están formando contactos sinápticos propiamente tal. Está ampliamente documentado que neuronas hipocampales *in vitro* pasan a través de distintas etapas de maduración y que finalmente son capaces de establecer contactos sinápticos funcionales entre sí (Fletcher y col., 1994). La determinación y cuantificación de contactos sinápticos en cultivos neuronales radica en la identificación de sus características estructurales particulares, y en la actualidad se lleva a cabo siguiendo básicamente dos metodologías experimentales distintas y complementarias. Por un lado está el uso de la microscopía electrónica, que permite mediante análisis de ultra estructura distinguir por morfología terminales presinápticos y postsinápticos adyacentes, definiéndose así un contacto sináptico. Por otra parte, mediante inmunocitoquímica se logra la identificación de proteínas sinápticas con una localización subcelular específica en los compartimentos pre o postsinápticos, lo que permite determinar y cuantificar contactos sinápticos *in vitro* (Glynn y McAllister, 2006; Schätzle y col., 2011). En estos términos experimentales, una sinapsis se define como la aposición o sobreposición parcial en la señal de fluorescencia de un marcador presináptico con un marcador postsináptico, en donde a cada marcador se le atribuye la señal de una sonda fluorescente específica (Schätzle y col., 2011) (Figura 14A). Con el propósito de determinar la densidad de contactos sinápticos en neuronas maduras se utilizó como marcador presináptico la proteína Synaptophysin I, y como marcador postsináptico a Homer 1, proteína de andamio que localiza específicamente en terminales postsinápticos de sinapsis glutamatérgicas, donde interactúa con la proteína PSD-95 y con receptores metabotrópicos de

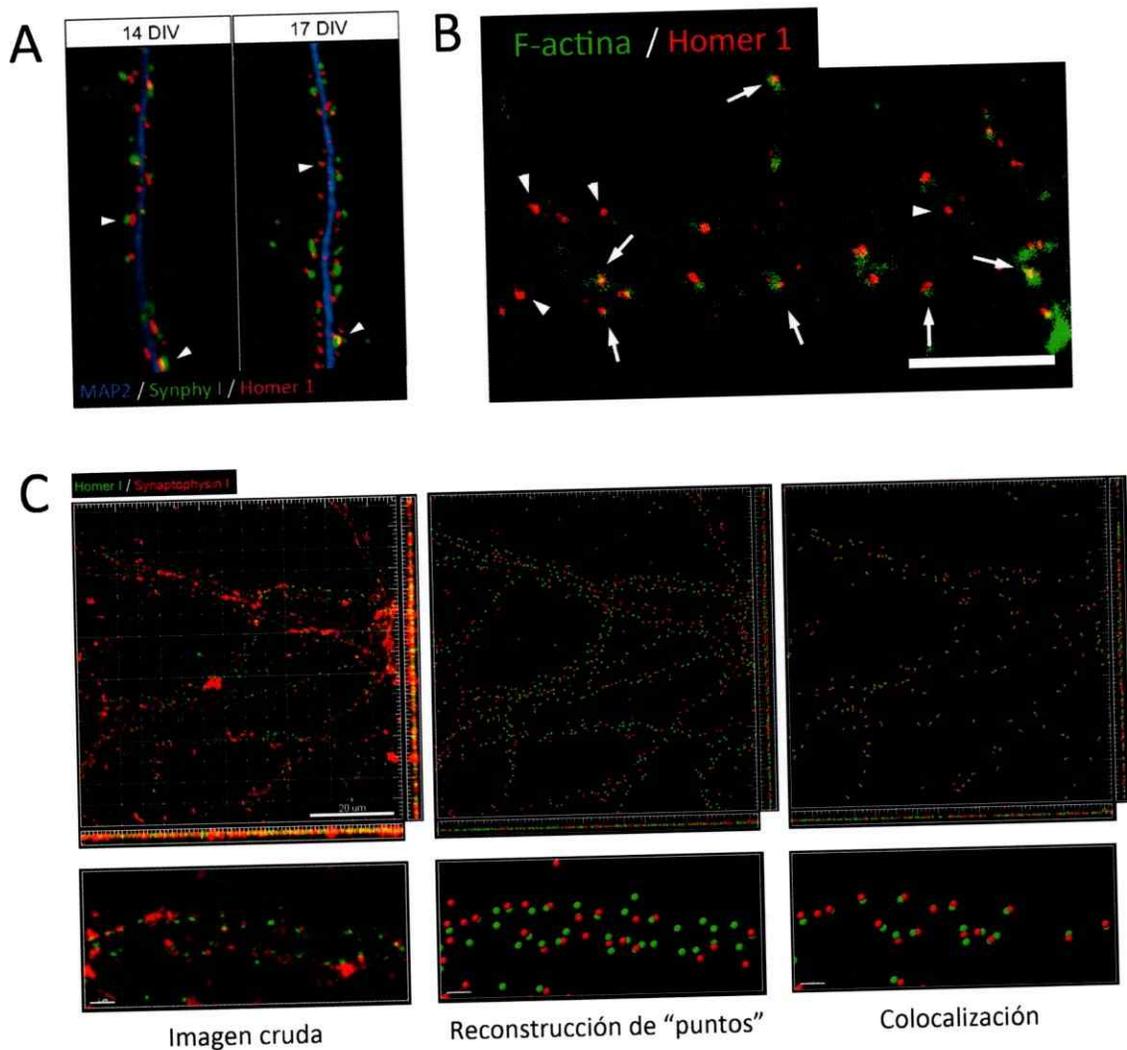


Figura 14. Determinación de contactos sinápticos mediante inmunocitoquímica. (A) Imagen modificada de Schätzle y col., 2011, donde se muestra una inmunocitoquímica sobre neuronas *in vitro*, utilizando como marcador presináptico a la proteína Synaptophysin I, y como marcador postsináptico, la proteína Homer 1. Con cabezas de flecha se muestran contactos sinápticos. (B) Inmunocitoquímica sobre neuronas WT de 21 DIV. La señal de actina polimerizada se muestra en verde y la señal de Homer 1 en rojo. La señal de Homer 1 co-distribuye con la marca de F-actina, en lo que correspondería a espinas dendríticas (flechas). Existe una proporción de puntos positivos para Homer 1 que no localizan en estructuras ricas en actina polimerizada (cabezas de flecha). Barra de tamaño 10 μm . (C) Protocolo de reconstrucción de puntos utilizando Imaris. Las estructuras generadas son filtradas de tal manera que solo se consideran aquellas que se encuentran en adyacentes formando contactos sinápticos (panel "colocalización"). Este protocolo permite calcular el porcentaje de terminales pre y postsinápticos totales que se encuentran formando sinapsis, y de este modo establecer un parámetro de comparación entre neuronas de distintos genotipos.

glutamato (Tu y col., 1999). Homer 1 se ha validado como marcador postsináptico en ensayos de inmunocitoquímica sobre neuronas en cultivo, donde co-localiza en forma parcial con marcadores presinápticos específicos, formando sinapsis (Schätzle y col., 2011; Andreska y col., 2014). En neuronas WT maduras hemos descrito que Homer 1 distribuye junto con la señal positiva Faloidina específica para F-actina, en estructuras que corresponderían a espinas dendríticas (Figura 14B, flechas). Cabe destacar que existe un porcentaje de *clusters* positivos para Homer 1 que es detectado en el cuerpo o *shaft* dendrítico, donde no co-localiza con la señal de F-actina (Figura 14B, cabezas de flecha). Considerando que Homer 1 presenta un patrón de expresión espacial punteado, similar al descrito para Synaptophysin I, se utilizó Imaris para generar reconstrucciones de puntos o "*spots*" positivos para ambos marcadores sinápticos. Tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos, se generaron dos protocolos de reconstrucción automatizada de puntos presinápticos y postsinápticos. Los resultados mostrados de ahora en adelante se basan en los datos obtenidos con el protocolo de reconstrucción de puntos con diámetro variable.

En total se generaron de manera automatizada 6494 puntos presinápticos positivos para Synaptophysin I, y 12331 puntos postsinápticos positivos para Homer 1, en un total de 16 reconstrucciones para el caso de neuronas hipocampales WT 21 DIV. Para neuronas hipocampales MAP1B *-/-* 21 DIV se generaron 5596 puntos presinápticos y 4526 puntos postsinápticos en un total de 18 reconstrucciones (Figura 15A). El análisis estadístico presentado a continuación se realiza en base al valor promedio obtenido en cada una de las reconstrucciones, y no al total de puntos generados. El resumen estadístico de los valores de área e intensidades de fluorescencia analizados considerando el total de puntos pre y postsinápticos generados para cada genotipo, se muestra en Anexo Tabla 1. No existe

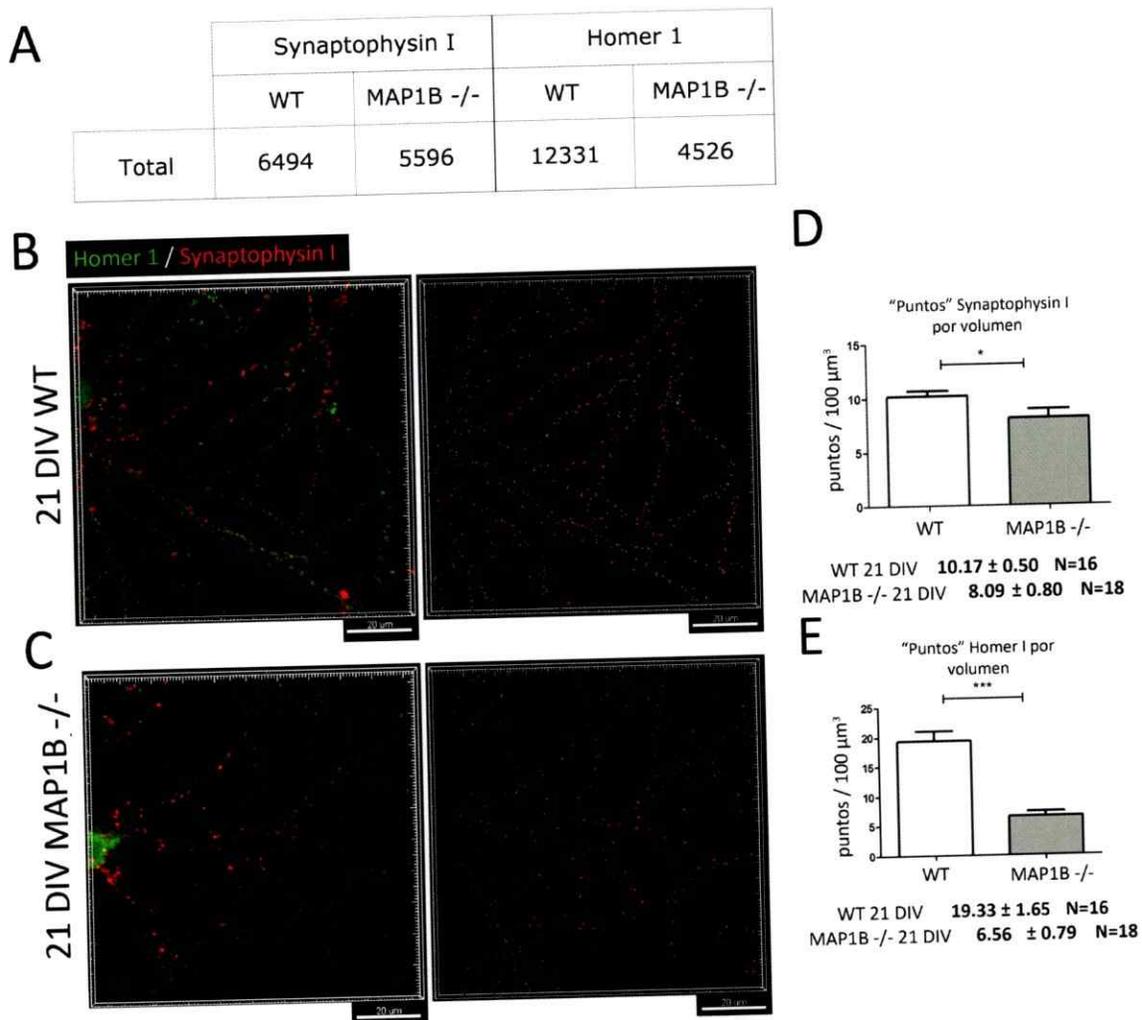


Figura 15. Neuronas MAP1B -/- presentan una disminución en la densidad de terminales presinápticos y postsinápticos. (A) Tabla donde se muestra la cantidad de puntos presinápticos y postsinápticos generados en forma automática para neuronas de los distintos genotipos. Imagen cruda y reconstrucción de terminales pre y postsinápticos en neuronas WT 21 DIV **(B)** y neuronas MAP1B -/- 21 DIV. **(C)** Cuantificación de la densidad de puntos presinápticos Synaptophysin positivos. Neuronas WT 10.17 ± 0.50 puntos / μm^3 n=16, y neuronas MAP1B -/- 8.09 ± 0.80 puntos / μm^3 n=18 (t-test $p < 0.05$). **(D)** Cuantificación de la densidad de puntos postsinápticos Homer 1 positivos. Neuronas WT 19.33 ± 1.65 puntos / μm^3 n=16, y neuronas MAP1B -/- 6.56 ± 0.79 puntos / μm^3 n=18 (t-test $p < 0.0001$).

diferencia en el volumen promedio de las reconstrucciones analizadas, donde para el caso de neuronas WT corresponde a $39636 \pm 1502 \mu\text{m}^3$, y para neuronas MAP1B -/- $38738 \pm 1214 \mu\text{m}^3$.

Esto, sumado al hecho que la densidad de neuronas sembradas para ensayos de inmunocitoquímica es igual entre neuronas de ambos genotipos, permite concluir que los análisis de densidad de puntos fueron llevados a cabo bajo condiciones experimentales comparables, independiente del genotipo neuronal. En las Figuras 15B y 15C se observan reconstrucciones representativas de neuronas mantenidas durante 21 DIV WT y MAP1B $-/-$ respectivamente, en donde las esferas rojas representan terminales presinápticos y las esferas verdes, terminales postsinápticos. El volumen de las esferas generadas guarda directa relación con el diámetro real de cada *cluster* de proteínas detectado por el programa computacional. Neuronas WT exhiben una densidad de 10.17 de puntos presinápticos por μm^3 (Figura 15D), y una densidad de 19.33 de puntos postsinápticos por μm^3 (Figura 15E). Sin embargo neuronas MAP1B $-/-$ muestran una densidad de 8.09 de puntos presinápticos por μm^3 (Figura 15D), lo que significa una disminución de un 24.39% en la densidad de terminales presinápticos respecto a la condición WT. De igual manera, neuronas MAP1B $-/-$ presentan una densidad de 6.56 puntos postsinápticos por μm^3 (Figura 15E), lo que se traduce en una reducción de un 66.06% en comparación a neuronas WT.

Una de las propiedades intrínsecas de los puntos generados que se analizan en el presente trabajo es el área, la que se define en forma automatizada de acuerdo a la región donde la señal de fluorescencia es detectable y comparativamente mayor a la señal *background* de fluorescencia en la imagen en cuestión. En este contexto se determinó que no existe variación en el área de terminales presinápticos entre neuronas WT y MAP1B $-/-$, lo que se observa en forma cualitativa en imágenes de inmunocitoquímica con marcaje de Synaptophysin I (Figura 16A), y en la cuantificación de los promedios del área de terminales

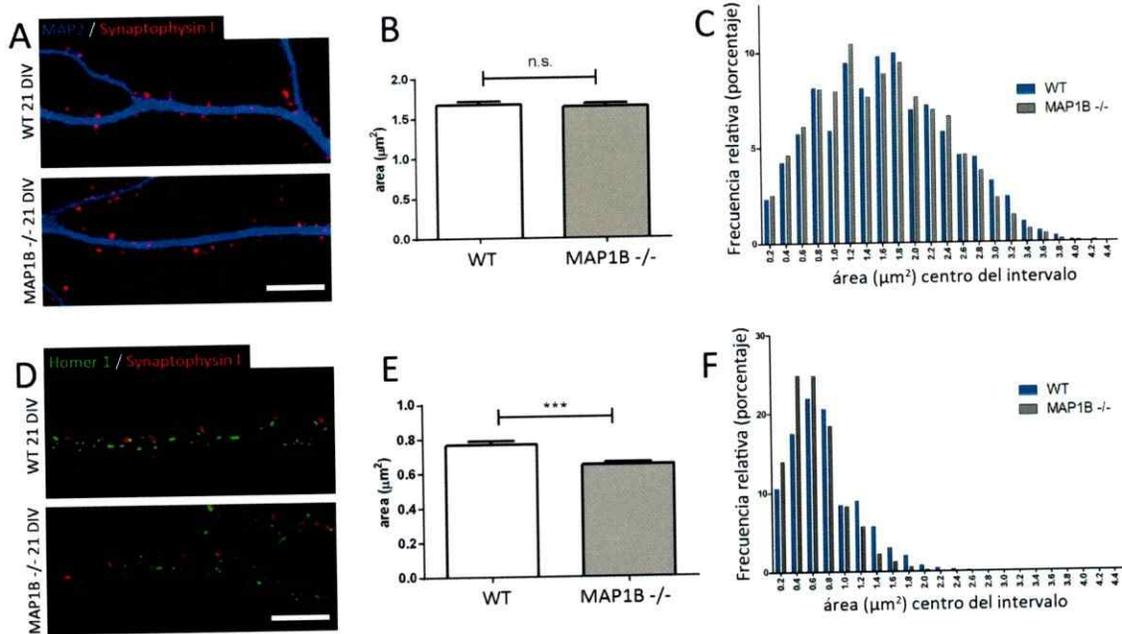


Figura 16. No existe diferencia en el área de terminales presinápticos entre neuronas WT y MAP1B -/-, sin embargo estas últimas presentan una reducción en el área de terminales postsinápticos. (A) Imagen representativa de Inmunocitoquímica de neuronas de 21 DIV, donde la señal de MAP2 se representa en azul, y la de Synaptophysin I en rojo. Barra de tamaño 10 μm . **(B)** El área promedio de terminales presinápticos en neuronas WT es de $1.67 \pm 0.042 \mu\text{m}^2$ $n=16$, y en neuronas MAP1B -/- $1.64 \pm 0.041 \mu\text{m}^2$ $n=18$ (t-test n.s.). **(C)** Gráfico de frecuencias relativas del área de puntos presinápticos donde cada intervalo corresponde a $0.2 \mu\text{m}^2$, abarcando desde 0.0 a $4.5 \mu\text{m}^2$. **(D)** Imagen representativa de Inmunocitoquímica de neuronas de 21 DIV, donde la señal Homer 1 se representa en verde, y la de Synaptophysin I en rojo. Barra de tamaño $10 \mu\text{m}$. **(E)** El área promedio de terminales postsinápticos en neuronas WT es de $0.77 \pm 0.021 \mu\text{m}^2$ $n=16$, y en neuronas MAP1B -/- $0.65 \pm 0.017 \mu\text{m}^2$ $n=18$ (t-test $p < 0.0001$). **(F)** Gráfico de frecuencias relativas del área de puntos postsinápticos donde cada intervalo corresponde a $0.2 \mu\text{m}^2$, abarcando desde 0.0 a $4.5 \mu\text{m}^2$.

presinápticos (Figura 16B). También se observa la distribución del total de datos analizados en el histograma de frecuencias relativas del área de puntos presinápticos (Figura 16C). Sin embargo neuronas MAP1B -/- presentan una disminución en el área de terminales postsinápticos positivos para la proteína Homer 1 (Figura 16D). El área de terminales

postsinápticos de neuronas WT es de $0.77 \pm 0.021 \mu\text{m}^2$, mientras que en neuronas MAP1B -/- este valor se reduce a $0.65 \pm 0.017 \mu\text{m}^2$, lo que significa una disminución de un 15.58% en el valor promedio del área de puntos postsinápticos.

Los otros dos parámetros evaluados corresponden a la intensidad de fluorescencia promedio y a la intensidad de fluorescencia máxima de los puntos generados en las reconstrucciones. La intensidad de fluorescencia promedio se define como el cociente entre la sumatoria de los valores de intensidad de fluorescencia absoluta de un grupo de píxeles, y el área que contiene al total de píxeles analizados en una región específica. Se ha descrito que la intensidad de fluorescencia promedio correspondiente a un marcador protéico específico determinada a través de inmunocitoquímica, se relaciona directamente con la abundancia relativa de la proteína en una región de interés establecida (Fejtova y col., 2009). No existen cambios en la intensidad de fluorescencia en los puntos positivos para Synaptophysin I entre neuronas WT y MAP1B -/- (Anexo Figura 1A y 1B). Sin embargo se observa una disminución en la intensidad de fluorescencia de los puntos postsinápticos positivos para Homer 1 en neuronas MAP1B -/- en comparación a neuronas WT (Anexo Figura 1C y 1D), lo que podría interpretarse como una reducción en los niveles locales de la proteína Homer 1 en terminales postsinápticos de neuronas MAP1B -/- maduras. La intensidad de fluorescencia máxima es utilizada como un parámetro para determinar si las condiciones de adquisición de imágenes son las apropiadas para realizar un análisis comparativo entre distintas condiciones. Se propone que mientras mayor sea la proporción de estructuras que alcancen el máximo en la intensidad de fluorescencia, menor será la validez del método comparativo. Siguiendo el protocolo de adquisición descrito en la sección de Materiales y Métodos, un pequeño porcentaje de los puntos positivos para Synaptophysin I se encuentran saturados y alcanzan el valor máximo de

intensidad de fluorescencia (1.29% en neuronas WT y 0.66% en neuronas MAP1B $-/-$). De igual manera, la proporción de puntos positivos para Homer 1 que alcanzan el máximo en intensidad de fluorescencia se mantiene poco representada (1.46% en neuronas WT y 0.09% en neuronas MAP1B $-/-$) (Anexo Figura 1E y 1F). Este antecedente permite validar el método de comparación, por lo menos en lo que respecta la intensidad de fluorescencia de las imágenes adquiridas.

Neuronas MAP1B $-/-$ maduras exhiben una disminución en la densidad de contactos sinápticos totales.

A partir de reconstrucciones tridimensionales se define un contacto sináptico como aquellos puntos presinápticos que se encuentran en contacto directo con al menos un punto postsináptico, y viceversa. Imaris de manera semi-automatizada determina que puntos se encuentran en contacto directo y los selecciona, de tal manera que genera un subgrupo de estructuras que corresponden a aquellos puntos que colocalizan con su contraparte sináptica complementaria. La representación visual de este proceso muestra el total de puntos detectados, presinápticos en rojo y postsinápticos en verde, como también aquellos puntos resultantes al aplicar el protocolo de colocalización, tanto para neuronas WT (Figura 17A) como para neuronas MAP1B $-/-$ (Figura 17B). El desglose del número de puntos analizados por genotipo y por marcador sináptico se resumen en la Figura 17C. Tal como se aprecia en la figura representativa, en neuronas MAP1B $-/-$ existe una disminución en la densidad de contactos sinápticos, revelado por la disminución en el porcentaje de puntos totales que se encuentra colocalizando con una estructura complementaria, donde en neuronas WT un $56.77\% \pm 1.37\%$ de los puntos totales colocaliza, mientras que en neuronas MAP1B $-/-$ este porcentaje disminuye a un $45.47\% \pm 3.25\%$ (Figura 17D). Esto significa una disminución de un 19.37% en la densidad de contactos sinápticos al comparar neuronas MAP1B $-/-$ con neuronas WT mediante este método. La proporción de puntos presinápticos deslocalizados, la cantidad de terminales pre y postsinápticos y la densidad de contactos sinápticos, fue analizada utilizando otro método de cuantificación basado en el programa ImageJ, obteniéndose resultados similares a los ya descritos. Este método de análisis se detalla en la sección Materiales y Métodos, y los

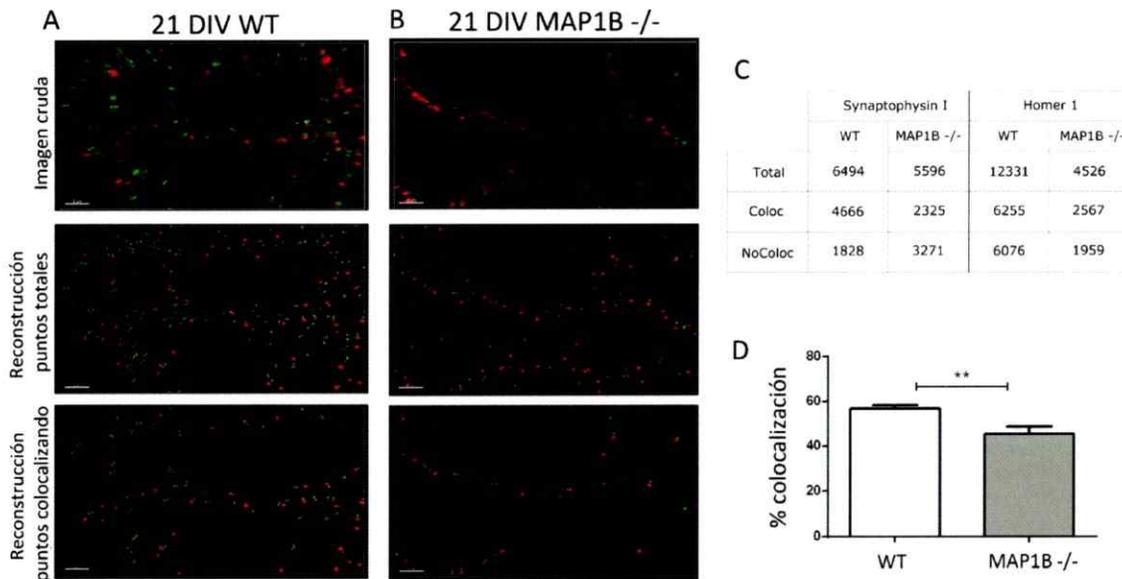


Figura 17. Existe una disminución en la densidad de contactos sinápticos en neuronas MAP1B -/- determinada mediante inmunocitoquímica. Imágenes representativas correspondientes inmunocitoquímica en neuronas WT (A) y MAP1B -/- (B). Panel superior muestra imágenes crudas de regiones dendríticas proximales al soma con tinción con anticuerpos contra Synaptophysin I (rojo) y Homer I (verde). Panel central muestra reconstrucciones tridimensionales realizadas con Imaris del total de puntos para ambos marcajes. Puntos rojos corresponden a reconstrucciones sobre el canal de Synaptophysin I, y puntos verdes, al canal de Homer 1. Panel inferior muestra reconstrucciones tridimensionales sometidas al filtro “colocalize spots”, que permite sólo visualizar los puntos pre- y postsinápticos que se encuentran en contacto directo. Puntos que colocalizan mediante esta estrategia se consideran contactos sinápticos propiamente tal. Barras de tamaño 5 μ m. (C) Tabla resumen con los datos numéricos considerados en el presente análisis. Total: puntos totales. Coloc: puntos que colocalizan. NoColoc: puntos que no colocalizan. (D) Cuantificación automatizada revela disminución en la proporción del total de puntos que colocalizan en neuronas MAP1B -/-. Neuronas WT presentan un 56.77% \pm 1.37% n=16 de colocalización de puntos totales, mientras que neuronas MAP1B -/- un 45.47% \pm 3.25% n=18 de colocalización de puntos totales (t-test $p < 0.005$).

resultados se resumen en el Anexo Figura 2 para la proporción de terminales presinápticos deslocalizados, y en el Anexo Figura 3 para la densidad de contactos sinápticos.

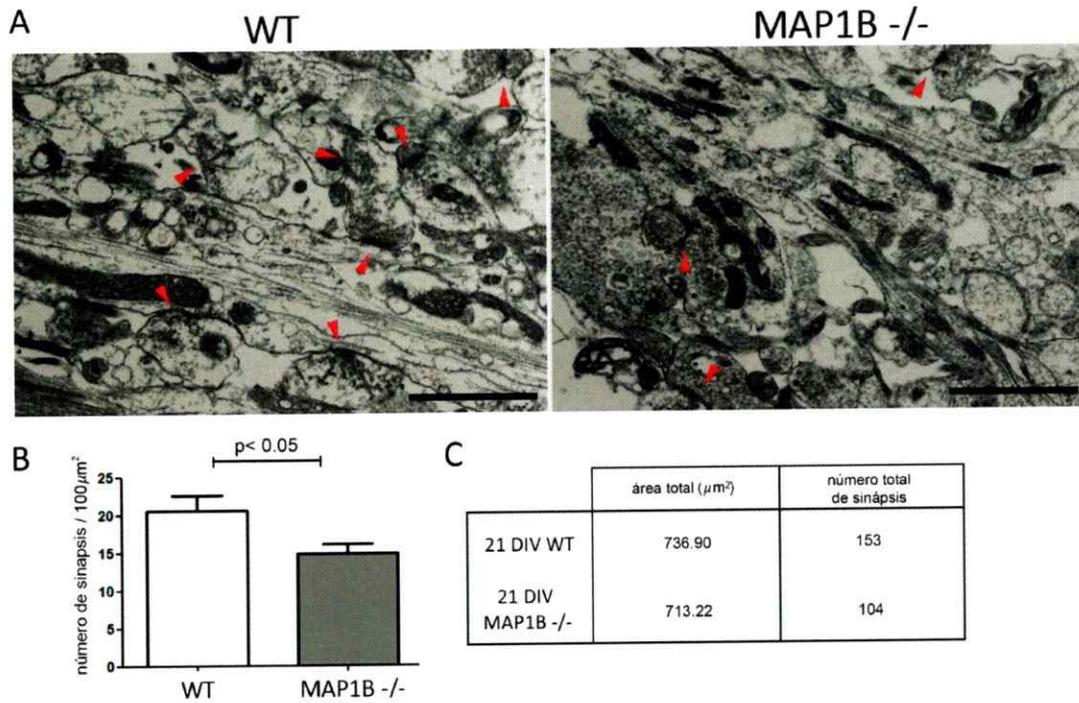


Figura 18. Número de contactos sinápticos se encuentra disminuido en neuronas MAP1B -/-, determinado mediante microscopía electrónica. (A) Micrografías electrónica representativa correspondientes a cultivo de neuronas hipocampales mantenidas en co-cultivo con astrocitos durante 21 DIV, tanto WT como MAP1B -/-. Cabezas de flecha rojas indican contactos sinápticos. Imágenes de ambos genotipos fueron adquiridas en aumento 11500X, barra de tamaño 1 μm . **(B)** Cuantificación del número de sinapsis (terminales presináptico y postsináptico adyacentes) por área. En neuronas WT 20.62 \pm 2.03 sinapsis por 100 μm^2 (n= 30 imágenes); en neuronas MAP1B -/- 14.82 \pm 1.29 sinapsis por 100 μm^2 (n= 32 imágenes). Barras representan promedio \pm error estándar, t-student $p < 0.05$. **(C)** Tabla resumen indicando el número total de área analizada y el número total de sinapsis contabilizadas para ambos genotipos.

Con el propósito de estudiar la ultra-estructura de terminales presinápticos se realizaron análisis a partir de imágenes de microscopía electrónica de neuronas hipocampales maduras *in vitro*. Imágenes adquiridas con un aumento de 11000X permiten distinguir compartimentos subcelulares con características estructurales particulares, por lo que se utilizó este subconjunto de imágenes para determinar la densidad de contactos sinápticos en cultivo

de neuronas maduras. Un contacto sináptico se define entonces como aquellas estructuras que presentan un terminal presináptico cargado de vesículas sinápticas, que se encuentra en yuxtaposición a un terminal postsináptico, donde en la interfase entre ambos compartimentos se distingue una región electrón-densa, que corresponde al conjunto de la zona activa presináptica y de la densidad postsináptica. Cabe destacar que esta definición estructural de un contacto sináptico abarca sinapsis formadas entre un terminal presináptico y una espina dendrítica o con el *shaft* dendrítico. Neuronas WT y MAP1B $-/-$ de 21 DIV generan contactos sinápticos distinguibles, los que son señalados con cabezas de flecha rojas en la Figura 18A. Neuronas WT presentan una densidad de contactos sinápticos totales de 20.62 ± 2.03 sinapsis por cada $100 \mu\text{m}^2$, mientras que en neuronas MAP1B $-/-$ este valor disminuye a 14.82 ± 1.29 sinapsis por $100 \mu\text{m}^2$ (Figura 18B), lo que se traduce en una reducción de un 28.12% en la densidad de contactos sinápticos en neuronas MAP1B $-/-$ respecto a neuronas WT, determinado mediante este método. Para esta cuantificación se analizó una superficie de tejido total similar en las imágenes de los cultivos de ambos genotipo (Figura 18C).

El fenotipo de terminales presinápticos se encuentra alterado en neuronas MAP1B $-/-$.

Imágenes adquiridas con un aumento de 43000X permiten analizar la estructura en detalle de un terminal presináptico, y se pueden distinguir e individualizar vesículas sinápticas, como se observa en las imágenes representativas de contactos sinápticos asimétricos en neuronas WT (Figura 19A) y MAP1B $-/-$ (Figura 19B), donde el terminal presináptico ha sido pseudocoloreado en púrpura y el terminal postsináptico en verde. Para el cálculo del área de

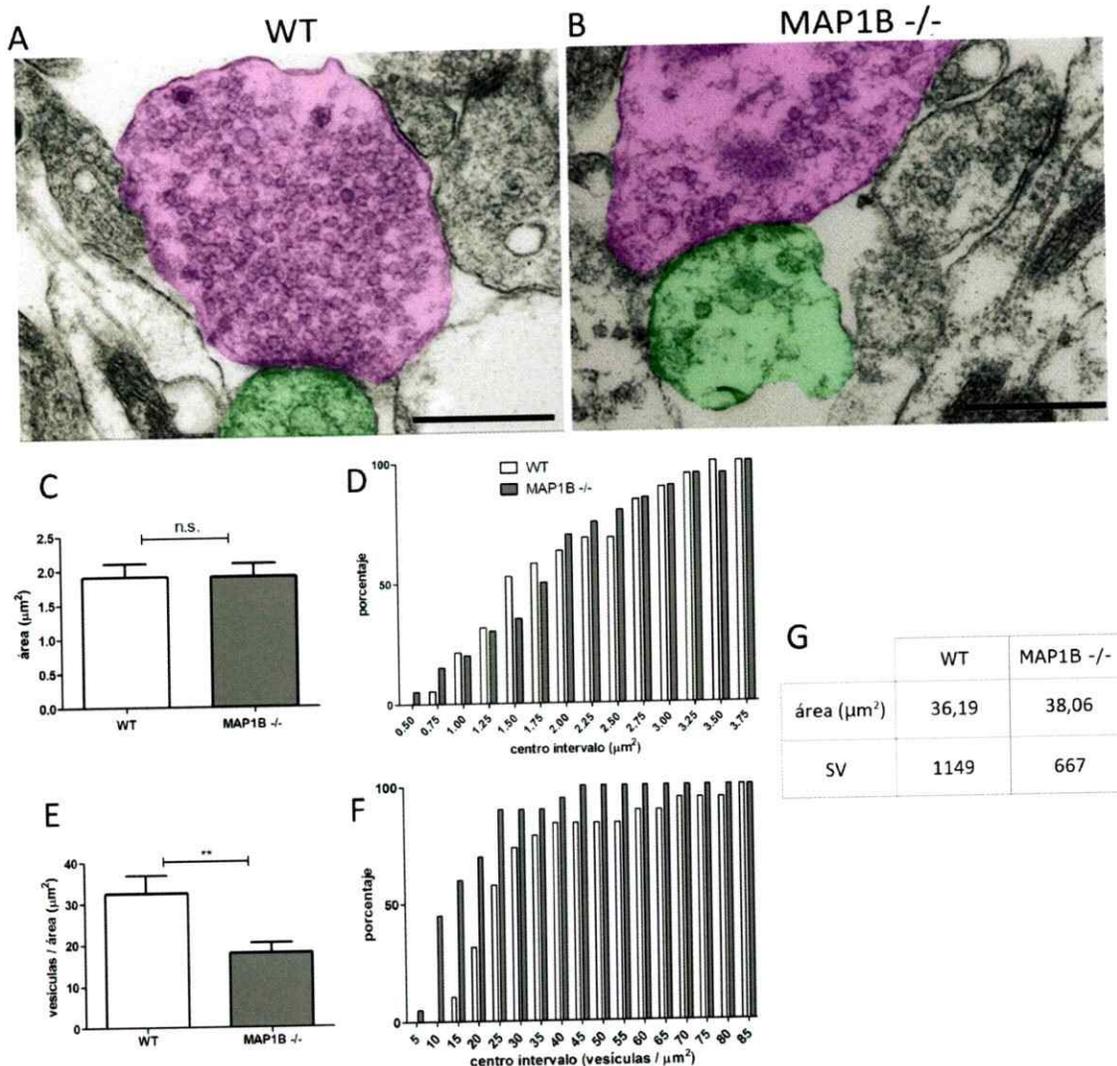


Figura 19. La densidad de vesículas sinápticas se encuentra disminuida en terminales presinápticos MAP1B^{-/-}. Micrografía electrónica representativa de un contacto sináptico en neuronas de 21 DIV WT (A) y MAP1B^{-/-} (B). Se distingue un terminal presináptico pseudocoloreado en púrpura, y un terminal postsináptico pseudocoloreado en verde, barra de tamaño 500 nm. (C) Cuantificación del área de terminales presinápticos WT es $1.905 \pm 0.20 \mu\text{m}^2$ (n=19 terminales); el área de terminales presinápticos MAP1B^{-/-} es $1.903 \pm 0.19 \mu\text{m}^2$ (n=20 terminales) (t-student, n.s.). (D) Histograma de frecuencia acumulada del área de terminales presinápticos de ambos genotipos. Cada intervalo corresponde a $0.25 \mu\text{m}^2$, abarcando desde 0.0 a $4.0 \mu\text{m}^2$. (E) Cuantificación de la densidad de vesículas sinápticas en terminales presinápticos de neuronas WT es 32.42 ± 4.38 vesículas / μm^2 (n=19 terminales); densidad de vesículas sinápticas en terminales presinápticos de neuronas MAP1B^{-/-} es 17.97 ± 2.40 vesículas / μm^2 (n=20 terminales) (t-student, $p < 0.05$). (F) Histograma de frecuencia acumulada de la densidad de vesículas sinápticas en terminales presinápticos de ambos genotipos. Cada intervalo corresponde a 5.0 vesículas por μm^2 , abarcando desde 0.0 a 90.0

vesículas por μm^2 . **(G)** Tabla que resume el total de área de terminales presinápticos analizada y el total de vesículas sinápticas cuantificadas para cada genotipo.

un terminal presináptico se considera la superficie bidimensional representada en cada imagen, de manera similar a como se ha descrito en la literatura (Tyler y Pozzo-Miller, 2001 y Hojjati y col., 2007). El área de los terminales presinápticos totales no presenta diferencias entre los distintos genotipos, siendo $1.905 \pm 0.20 \mu\text{m}^2$ para neuronas WT y $1.903 \pm 0.19 \mu\text{m}^2$ para neuronas MAP1B $-/-$ (Figura 19C). La distribución de los valores del área de los distintos terminales presinápticos analizados se muestra en el gráfico de frecuencias acumuladas (Figura 19D). Sin embargo existe una disminución en la densidad de vesículas sinápticas presentes en terminales presinápticos de neuronas MAP1B $-/-$. Mientras que en neuronas WT la densidad de vesículas sinápticas es en promedio de 32.42 ± 4.38 vesículas por μm^2 , este valor disminuye a 17.97 ± 2.40 vesículas por μm^2 en neuronas MAP1B $-/-$ (Figura 19E), lo que corresponde a una reducción de 44.57 %. La distribución de los valores de las densidad de vesículas sinápticas se muestra en el gráfico de frecuencias acumuladas (Figura 19F). El área total de terminales presinápticos analizada es similar para neuronas de ambos genotipos (Figura 19G).

En cultivos de neuronas tanto WT como MAP1B $-/-$ se distinguen contactos sinápticos formados entre el terminal presináptico y el cuerpo o *shaft* dendrítico, como se observa en la Figura 20A para neuronas WT y Figura 20B para neuronas MAP1B $-/-$. Este tipo de sinapsis se ha descrito en neuronas hipocampales *in vitro* como un contacto sináptico inmaduro que da lugar a la formación de una sinapsis madura adyacente, entre el axón y una espina dendrítica

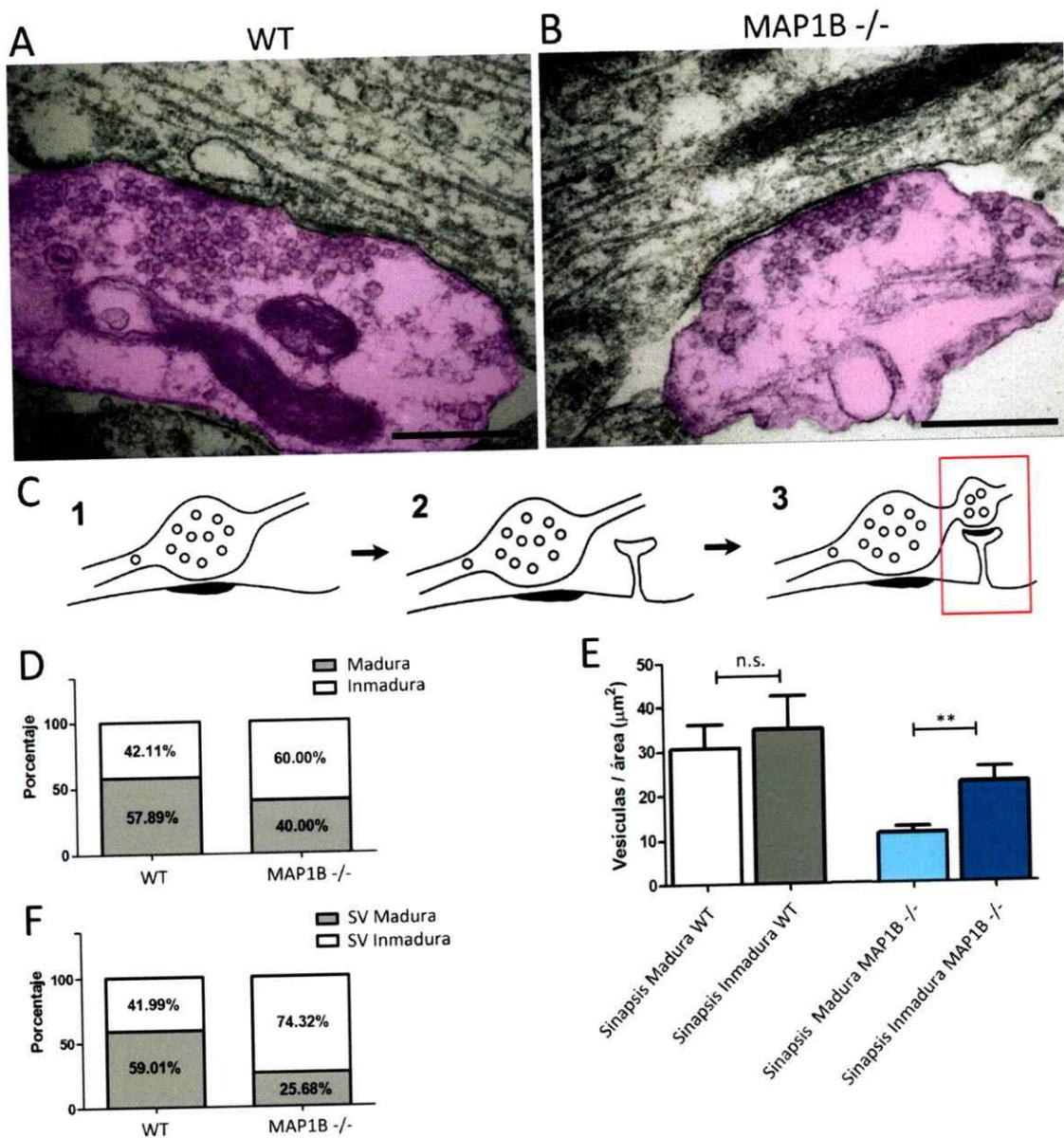


Figura 20. Neuronas MAP1B^{-/-} exhiben un aumento en la proporción de sinapsis inmaduras. Micrografía electrónica representativa de una sinapsis inmadura, conformada por un compartimento presináptico axonal (pseudocoloreado en púrpura) y el *shaft* dendrítico, en neuronas de 21 DIV WT (A) y MAP1B^{-/-} (B). (C) Esquema del fenómeno de maduración sináptica, donde a partir de un contacto sináptico inmaduro se da paso a la formación de una sinapsis madura (modificado de Reilly y col., 2011). (D) Cuantificación del tipo de contacto sináptico por genotipo. Sinapsis maduras WT 57.89%, sinapsis inmaduras WT 42.11%. Sinapsis maduras MAP1B^{-/-} 40.00%, sinapsis inmaduras MAP1B^{-/-} 60.00%. (E) Cuantificación de la densidad de vesículas sinápticas en distintos tipos de contactos sinápticos. Sinapsis maduras (30.60 ± 5.49 n=11) e inmaduras (34.91 ± 7.50 n=8) en neuronas WT, t-test, n.s. Sinapsis maduras (11.19 ± 1.37 n=8) comparadas con sinapsis inmaduras (22.50 ± 3.34 n=12) en

neuronas MAP1B $-/-$, t-test $p < 0.05$. Valores indican vesículas por μm^2 . (F) Cuantificación del total de vesículas sinápticas presente en cada tipo de contacto sináptico. En neuronas WT un 59.09% de SV se encuentran en sinapsis maduras, y un 41.99% en sinapsis inmaduras. En neuronas MAP1B $-/-$ un 25.68% de SV se encuentran en sinapsis maduras, y un 74.32% en sinapsis inmaduras.

(Figura 20C) (Reilly y col., 2011). Del total de contactos sinápticos analizados, en neuronas WT el 42.11% corresponde a sinapsis inmaduras, mientras que el 57.89% corresponde a sinapsis maduras formadas entre un terminal presináptico y una espina dendrítica. En neuronas MAP1B el porcentaje de sinapsis inmaduras aumenta a un 60.00%, con una consecuente disminución a un 40.00% de contactos sinápticos maduros (Figura 20D). Al analizar la densidad de vesículas sinápticas entre tipos de contactos sinápticos, se observa que no existe cambio entre sinapsis maduras e inmaduras en neuronas WT (sinapsis maduras 30.60 ± 5.49 e inmaduras 34.91 ± 7.50 vesículas sinápticas por μm^2), sin embargo en neuronas MAP1B $-/-$ existe una disminución en la densidad de vesículas sinápticas en sinapsis maduras en comparación a sinapsis inmaduras (11.19 ± 1.37 y 22.50 ± 3.34 vesículas sinápticas por μm^2 , respectivamente) (Figura 20E). Este mismo fenómeno se observa al analizar el número total de vesículas sinápticas presente en cada tipo de contacto sinápticos para ambos genotipos (Figura 20F).

Se ha descrito que sinapsis simétricas formadas entre un terminal presináptico y el *shaft* dendrítico pueden corresponder a contactos sinápticos inhibitorios, que utilizan como neurotransmisores a GABA o glicina principalmente. En hipocampo y corteza de murinos, los terminales presinápticos de sinapsis inhibitorias desde un punto de vista estructural se caracterizan por poseer vesículas sinápticas pleomórficas, de morfología alargada e irregular,

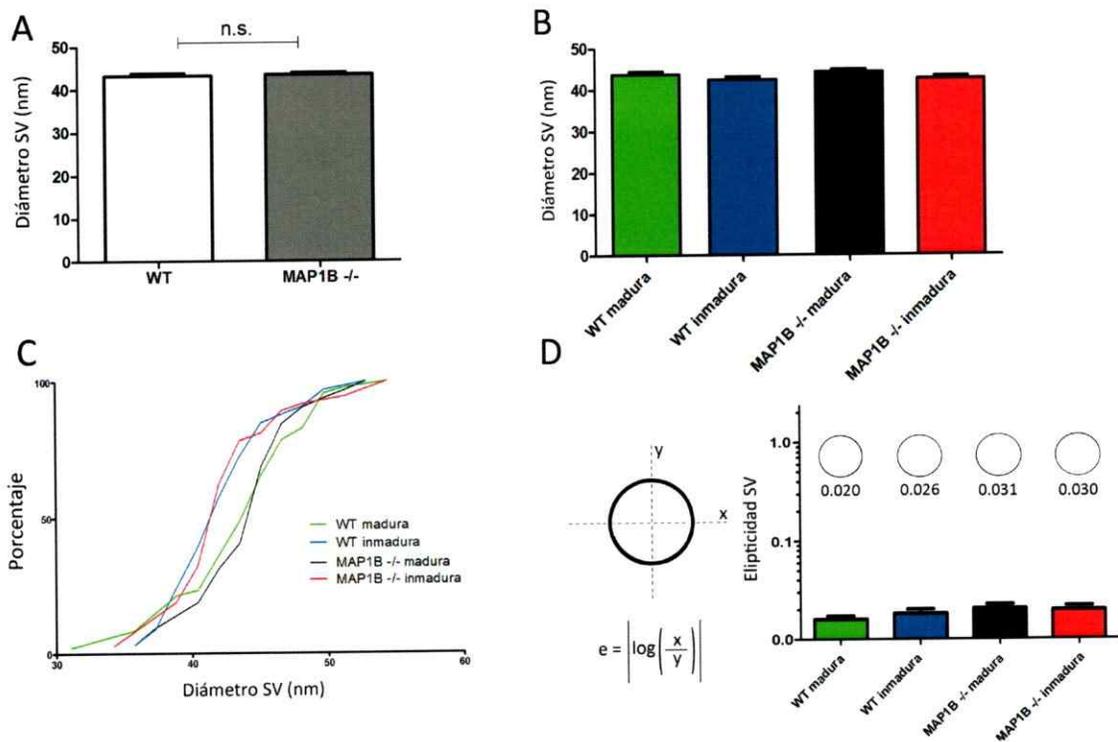


Figura 21. Análisis de propiedades morfológicas de vesículas sinápticas. (A) Cuantificación del diámetro de vesículas sinápticas totales entre neuronas de ambos genotipos. Diámetro de vesículas sinápticas en neuronas WT 43.23 ± 0.51 nm $n=80$, neuronas MAP1B -/- 43.39 ± 0.50 nm $n=69$, t-test diferencias no significativas. (B) Cuantificación del diámetro de vesículas sinápticas según el tipo de contacto sináptico y genotipo. Diámetro de vesículas sinápticas en neuronas WT, contactos maduros 43.74 ± 0.72 nm $n=47$; contactos inmaduros 42.49 ± 0.68 nm $n=33$. Diámetro de vesículas sinápticas en neuronas MAP1B -/-, contactos maduros 44.30 ± 0.67 nm $n=32$; contactos inmaduros 42.60 ± 0.70 nm $n=37$. ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, diferencias no son significativas al comparar todos los grupos de datos. (C) Gráfico de frecuencia acumulada de los valores de diámetro de vesículas sinápticas en los distintos tipos de contactos sinápticos y entre genotipos. (D) Determinación de la elipticidad de vesículas sinápticas. Coeficiente de elipticidad de calcula utilizando la ecuación presentada, donde x e y corresponden a los valores de diámetro perpendiculares entre sí, determinados arbitrariamente sobre una vesícula sináptica. Coeficiente de elipticidad en neuronas WT, contactos maduros 0.020 ± 0.022 $n=47$; contactos inmaduros 0.026 ± 0.024 $n=33$. Coeficiente de elipticidad en neuronas MAP1B -/-, contactos maduros 0.031 ± 0.024 $n=32$; contactos inmaduros 0.030 ± 0.025 $n=37$. ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, diferencias no son significativas al comparar todos los grupos de datos. Se representa la morfología respectiva a cada grupo de acuerdo al coeficiente de elipticidad promedio calculado, considerando el eje x horizontal.

que co-distribuyen con el transportador vesicular de GABA (*vesicular GABA transporter*, vGAT) (Chaudhry y col., 1998 y Dumoulin y col., 1999). De manera complementaria, en la región CA3 del hipocampo, terminales presinápticos cargados con vesículas pleomórficas contactan regiones postsinápticas positivas para receptor de glicina (*glycine receptor*, GlyR) (Danglot y col., 2004). En adición, esta característica estructural se ha utilizado como parámetro para determinar terminales presinápticos de aferencias inhibitorias en cortes histológicos provenientes de cerebro de mamíferos (Oliver y Shneiderman, 1989). Con estos antecedentes en consideración, se analizó el diámetro y la elipticidad de vesículas sinápticas como propiedades morfológicas características de estas estructuras. No hay variaciones en el diámetro de vesículas sinápticas presentes en neuronas de ambos genotipos, siendo 43.23 ± 0.51 nm en neuronas WT y 43.39 ± 0.50 nm en neuronas MAP1B $-/-$ (Figura 21A). Al comparar los diámetros de vesículas sinápticas presentes en contactos sinápticos maduros e inmaduros, en neuronas de ambos genotipos tampoco se observa cambios significativos, aunque si existe una tendencia a que las vesícula sinápticas en sinapsis inmaduras sean de menor diámetro independiente del genotipo (Figura 21B y 21C). Se definió como parámetro para analizar la morfología de vesículas sinápticas la elipticidad de estas estructuras. A mayores valores del coeficiente de elipticidad, mayor es la diferencia entre dos ejes perpendiculares trazados sobre una estructura esférica, lo que se traduce en una morfología alargada y achatada, característica de vesículas sinápticas pleomórficas. Por el contrario, mientras menores y más cercanos a cero sean los valores del coeficiente de elipticidad, mayor grado de simetría poseerá la estructura analizada. Los valores del coeficiente de elipticidad de las vesículas sinápticas en sinapsis maduras e inmaduras no varían, como tampoco existen cambios entre genotipos (figura 21D). Cabe destacar que los valores de elipticidad son bajos y dan cuenta de estructuras

prácticamente simétricas tal como se representa en el esquema de la Figura 21D. Según este parámetro las vesículas sinápticas analizadas no poseen una estructura pleomórficas, sino que son simétricas y esféricas, sugerentes de sinapsis excitatorias sobre el cuerpo neuronal o el *shaft* dendrítico.

Otro tipo de estructura distinguible en las micrografías electrónicas, son vesículas esféricas de mayor tamaño que las vesículas sinápticas, que se caracterizan por poseer una región central o núcleo electrón-denso. Este tipo vesicular recibe el nombre genérico de DCV (*dense core vesicles*), y se ha descrito que pueden contener neuropéptidos, factores de crecimiento y ciertos neurotransmisores, como también componentes protéicos necesarios para el ensamblaje de la zona activa presináptica (Torrealba y Carrasco 2005, y Sorra y col., 2006). La morfología de este tipo vesicular presente en un terminal presináptico se aprecia en la Figura 22A. DCVs se encuentran presentes en terminales presinápticos de neuronas tanto WT como MAP1B (Figura 22B), sin embargo la proporción de terminales presinápticos positivos para al menos 1 vesícula de núcleo denso, se encuentra drásticamente disminuida en neuronas MAP1B *-/-* en comparación a neuronas WT (Figura 22C). Desde un punto de vista morfológico, no existe cambio en el diámetro de las DCVs entre neuronas de ambos genotipos, siendo 77.47 nm y 80.75 nm de diámetro en neuronas WT y MAP1B *-/-* respectivamente (Figura 22D).

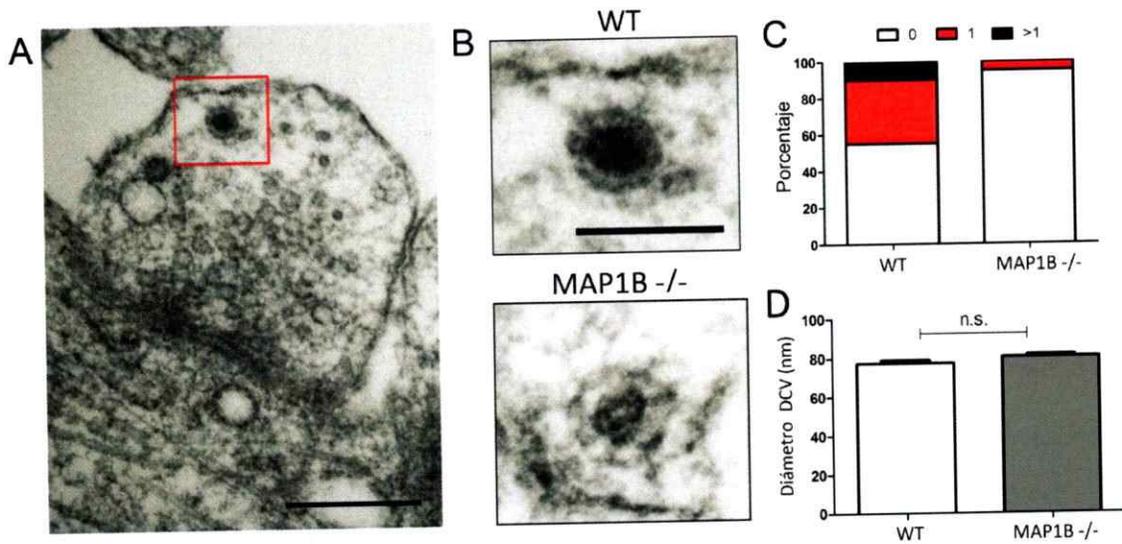


Figura 22. Neuronas MAP1B^{-/-} exhiben una disminución en la proporción de terminales presinápticos positivos para vesículas de núcleo denso (DCVs). (A) Micrografía electrónica representativa de un terminal presináptico de una neurona WT 21 DIV donde se pueden apreciar vesículas sinápticas claras y una vesícula de núcleo denso (barra de tamaño 250 nm). (B) DCVs se encuentran presentes en terminales presinápticos WT y MAP1B^{-/-} (barra de tamaño 100 nm). (C) Proporción de terminales presinápticos sin DCVs (blanco), con 1 PTV (rojo) y con más de un PTV (negro). Para terminales presinápticos de neuronas WT la proporción es: 55% sin DCV, 35% con 1 DCV y 10% con más de 1 DCV. Para terminales presinápticos de neuronas MAP1B^{-/-} la proporción es: 95% sin DCV, 5% con 1 DCV y 0% con más de 1 DCV (n=19 terminales para neuronas WT y n=20 terminales para neuronas MAP1B^{-/-}). (D) Cuantificación de diámetro de DCVs en ambos genotipos. Neuronas WT 77.47 ± 1.58 nm N=18, y neuronas MAP1B^{-/-} 80.75 ± 0.98 nm N=5, t-test diferencia no significativa.



La proteína Snapin endógena prevalece en forma de homo-dímero

Como se mencionó anteriormente, la proteína Snapin es capaz de homo-dimerizar *in vitro*, y es la forma dimérica la que ejerce de manera más eficiente el rol fisiológico de Snapin en terminales presinápticos, que es potenciar la interacción entre las proteínas SNAP-25 y Synaptotagmin I (Pan y col., 2009). Se realizaron ensayos de *knockdown* utilizando shRNAs contra la proteína Snapin en células del neuroblastoma N2A derivado de ratón. En este experimento se transfectaron tres shRNAs distintos, cuyas secuencias poseen una coincidencia del 100% solo contra la región codificante en la secuencia de Snapin en ratón (*mus musculus*), y no así contra la secuencias codificantes para otros transcritos (ver sección de Materiales y Métodos para las secuencias blanco de cada construcción). En células N2A control, sin transfectar, la expresión de Snapin endógeno es detectada a 17 kDa, banda que correspondería al monómero, y a 34 kDa aproximadamente, banda que correspondería al dímero de Snapin. Análisis cualitativo sobre *immunoblot* de células transfectadas con los shRNA específicos contra Snapin muestran una disminución en los niveles de Snapin endógeno en su forma dimérica (Figura 23A). Con el propósito de analizar si efectivamente Snapin es capaz de formar homo-dímero en nuestro sistema experimental, se decidió utilizar la técnica de complementación bimolecular de fluorescencia (*Bimolecular Fluorescence Complementation*, BiFC), en la que la interacción directa de dos proteínas o fragmentos protéicos, restablece la estructura terciaria de la proteína fluorescente amarilla (*Yellow fluorescent protein*, YFP), y por ende se restablece la emisión de fluorescencia que no posee cada fragmento por separado (Figura 23B) (Kerppola 2006). Se clonó la secuencia de cDNA Snapin de ratón *full-length* WT y mutante no dimerizante, donde la cisteína 66 ha sido reemplazada por una alanina (C66A), en los vectores codificantes para la región amino-terminal (NYFP) y carboxilo-terminal (CYFP) de la proteína fluorescente

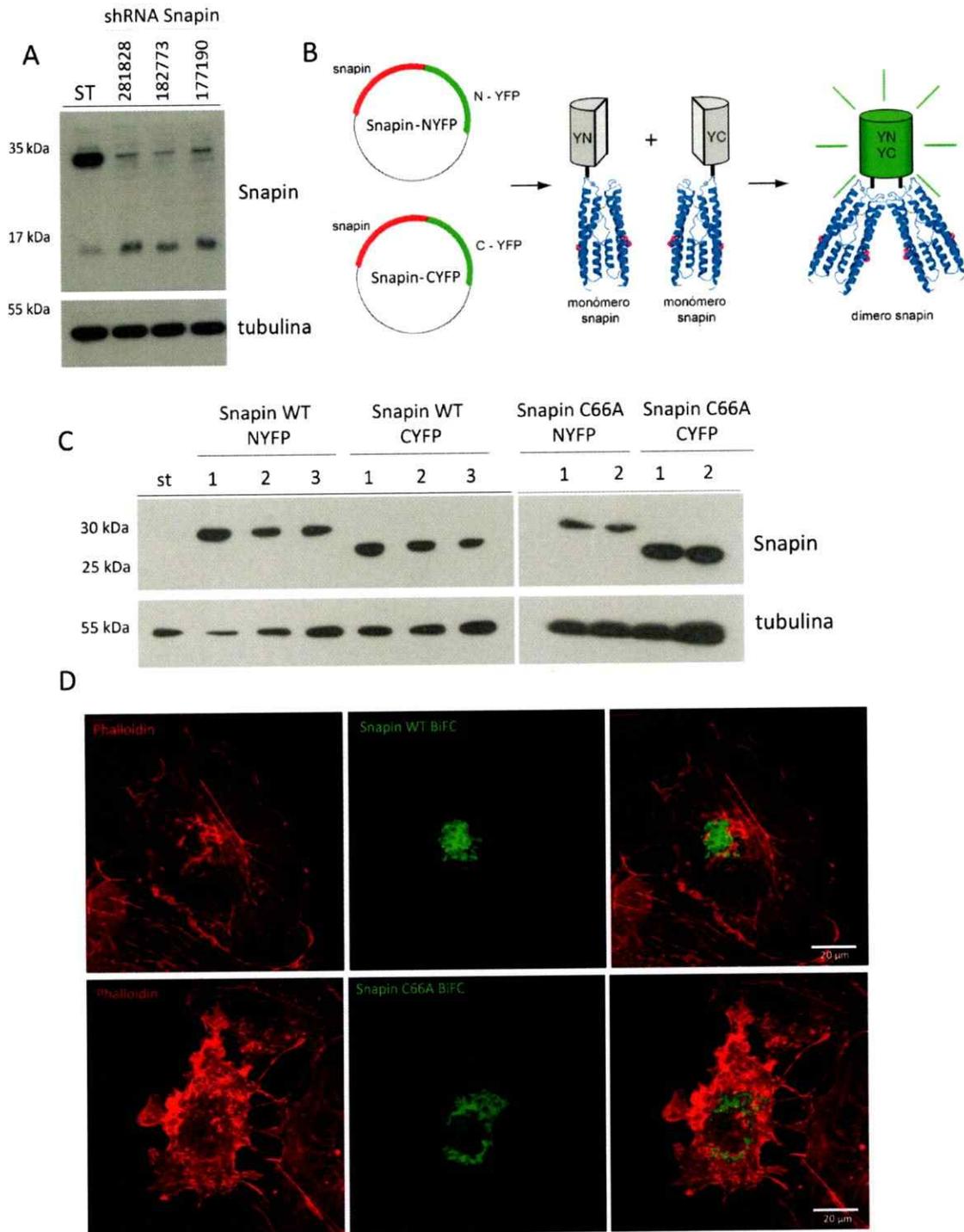


Figura 23. La proteína Snapin endógena prevalece en forma de homo-dímero. (A) *Inmunoblot* de extracto protéico de células del neuroblastoma de ratón N2A transfectadas con los shRNA contra Snapin 182818, 182773 y 177190. Como control de carga se utiliza α -tubulina. 30 μ g de proteínas totales por carril **(B)** Esquema de la técnica de complementación bimolecular de

fluorescencia (BiFC), representado específicamente para la dimerización de Snapin (Modificado de Kerppola 2006 y Navarro y col., 2012). **(C)** Expresión de los constructos Snapin WT-NYFP y Snapin WT-CYFP (panel izquierda), y Snapin C66A-NYFP y Snapin C66A-CYFP (panel derecha) en células COS7. Se muestran tres clones y dos clones obtenidos para cada constructo respectivamente. Se utiliza α -tubulina como control de carga. 30 μ g de proteínas totales por carril **(D)** Inmunocitoquímica sobre células COS7 co-transfectadas con los vectores Snapin WT-NYFP y Snapin WT-CYFP (panel superior), y Snapin C66A-NYFP y Snapin C66A-CYFP (panel inferior) donde en verde se observa la señal de la reconstitución de la fluorescencia de YFP producto de la interacción de los monómeros de Snapin. En rojo se observa la señal de F-actina utilizada para determinar la extensión de la superficie celular. Barra de tamaño 20 μ m.

amarilla, cuya expresión en clones distintos se demuestra mediante *immunoblot* por triplicado y duplicado para Snapin WT y C66A respectivamente (Figura 23C). En células COS7 co-transfectadas tanto con los vectores Snapin WT-NYFP / Snapin WT-CYFP y Snapin C66A-NYFP / Snapin C66A-CYFP se aprecia que Snapin recombinante dimeriza *in situ* en los lugares donde se detecta fluorescencia producto del restablecimiento de la estructura de YFP (Figura 23D). El hecho que se detecte fluorescencia con los constructos que codifican para Snapin WT y para Snapin C66A sugiere que la interacción entre monómeros de Snapin podría estar ocurriendo a través de una interacción no covalente, de manera independiente al enlace disulfuro generado por el residuo cisteína 66. Cabe destacar que al co-transfectar los vectores NYFP y CYFP vacíos en células COS7, se observa una señal de fluorescencia basal, ubicua y homogénea en el cuerpo celular, sin un patrón de expresión espacial característico. La transfección de cada uno de los vectores vacíos por separado tampoco genera emisión de fluorescencia detectable (Anexo Figura 4).

Neuronas MAP1B $-/-$ presentan una disminución en los niveles de la conformación dimérica de Snapin.

Como se mostró previamente, no existen cambios en la masa de un subconjunto de distintas proteínas sinápticas entre genotipos WT y MAP1B deficiente, tanto en etapa embrionaria como en etapa adulta (Figura 10 y Figura 11). A partir de extractos protéicos provenientes de cerebros, es posible distinguir a la proteína Snapin en sus conformaciones de monómero y dímero en condiciones de sobreexposición de la película fotográfica en la que el *immunoblot* es revelado (Figura 24A). Cualitativamente no se observan variaciones en el nivel de expresión del monómero de Snapin entre los distintos genotipos analizados, sin embargo se observa una disminución en el nivel de su forma dimérica en neuronas MAP1B $-/-$ en comparación a neuronas WT. Se ha descrito que el rol fisiológico de Snapin como potenciador de la interacción entre el sensor de calcio Synaptotagmin I y la proteína t-SNARE SNAP-25, es ejercido por Snapin en su conformación dimérica (Pan y col., 2009), razón por la cual decidimos analizar específicamente los niveles del dímero de Snapin, correspondiente a su unidad funcional. Existe una disminución significativa en la señal correspondiente al dímero de la proteína Snapin en tejido cerebral embrionario E18.5 de animales MAP1B $-/-$ en comparación a animales WT. Sin embargo, no existe una variación significativa entre animales MAP1B $+/-$ y WT (Figura 24B), sugiriendo que la disminución de la conformación dimérica de Snapin asociada a la pérdida de función de MAP1B no es dosis dependiente. Al analizar durante etapas adultas, también se observa una disminución en los niveles del dímero de Snapin en cultivos corticales de 13 DIV de neuronas MAP1B $-/-$ en comparación a neuronas WT (Figura 24C). Mediante inmunocitoquímica sobre neuronas de 21 DIV, se observa que cualitativamente existe una disminución en la señal de fluorescencia correspondiente al marcaje de la proteína

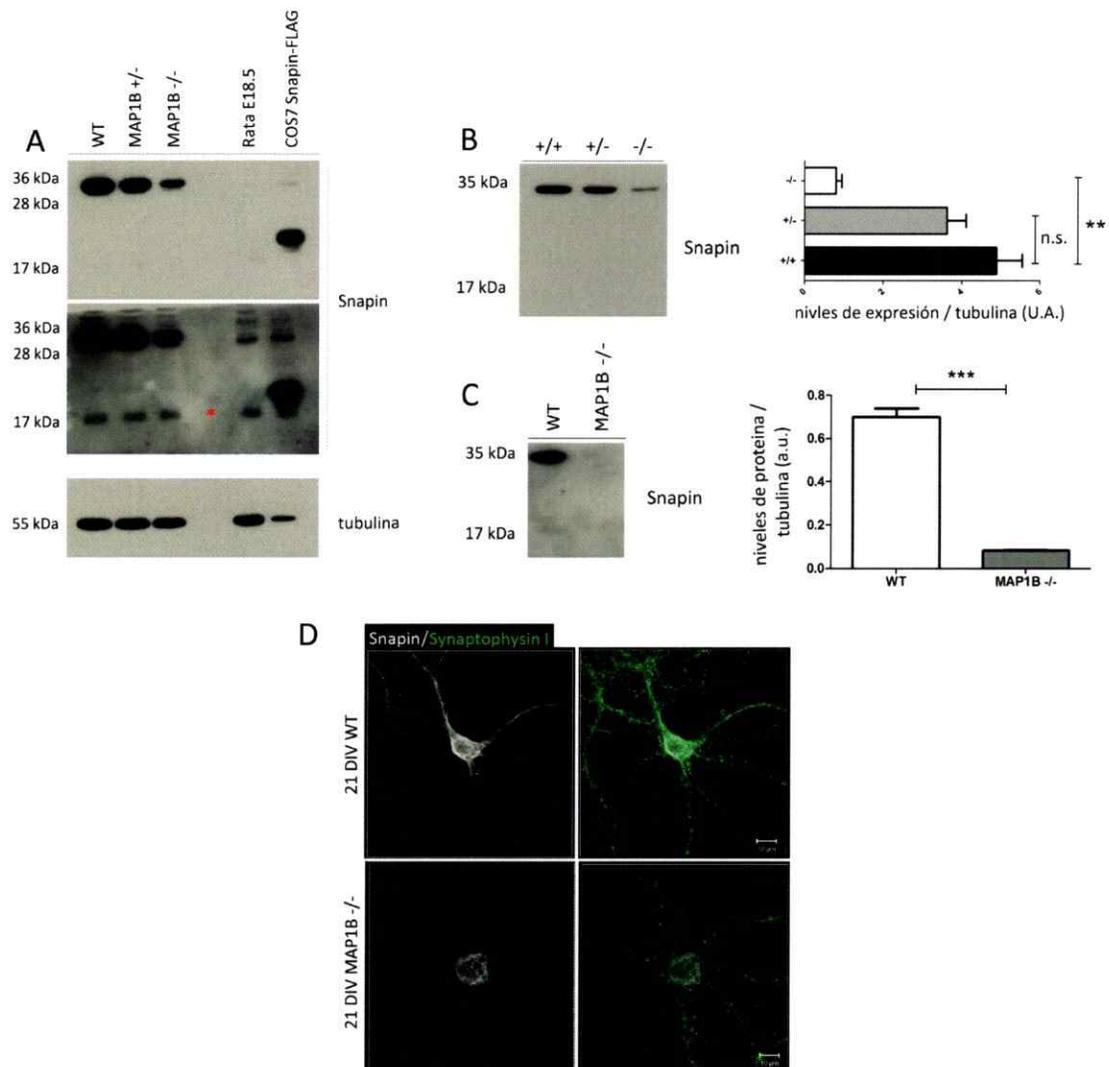


Figura 24. Existe una disminución en los niveles de la conformación dimérica de Snapin neuronas MAP1B -/-. (A) *Inmunoblot* utilizando anticuerpo contra Snapin a partir de extractos proteicos de cerebros embrionarios E18.5 de ratones de distintos genotipos, cerebro embrionario E18.5 de rata y células COS7 transfectadas con Snapin recombinante. Panel central corresponde a película fotográfica sobre-expuesta donde se aprecia banda de Snapin monómero señalada con asterisco rojo. (B) *Inmunoblot* de la expresión de Snapin en cerebros embrionarios E 18.5. Cuantificación de la banda del dímero de Snapin WT 4.89 ± 0.66 , MAP1B +/- 3.62 ± 0.49 , MAP1B -/- 0.80 ± 0.15 . Todos los valores corresponden a unidades arbitrarias, $n=3$ para cada condición. ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, $p < 0.05$ entre condición WT y MAP1B -/-. 30 μ g de proteínas totales por carril. (C) *Inmunoblot* de la expresión de Snapin en cultivos corticales de 13 DIV. Cuantificación de la banda del dímero de Snapin WT 0.70 ± 0.04 $n=3$, MAP1B -/- 0.083 ± 0.002 $n=3$. Todos los valores corresponden a unidades arbitrarias, t-test $p < 0.0001$. 30 μ g de proteínas totales por carril. (D) Inmunoquímica sobre neuronas de 21

DIV WT y MAP1B $-/-$. En blanco se muestra la señal correspondiente a Snapin, en verde la señal de Synaptophysin I. Barra de tamaño 10 μm .

Snapin en neuronas MAP1B $-/-$ en comparación a neuronas WT (Figura 24D). Con la finalidad de descartar que la disminución en los niveles del dímero de Snapin sea producto de la desestabilización de microtúbulos en desmedro de funciones no relacionadas con la estabilización de microtúbulos en neuronas MAP1B $-/-$, se analizó la expresión de Snapin en extractos protéicos de cerebros provenientes de animales KO para la proteína Tau (Figura 25A). Se ha descrito que la proteína Tau se une y estabiliza microtúbulos en condiciones fisiológicas (Avila y col., 2004 y Wang y Liu, 2008), y que la sobreexpresión de proteínas de unión a microtúbulos como Tau y MAP2, promueven la formación de manojos o *bundles* de microtúbulos en células COS7, no así MAP1B, la que colocaliza a lo largo de microtúbulos pero no genera reorganización en la estructura del citoesqueleto de microtúbulos (Takemura y col., 1992). La expresión de Tau es nula en extractos protéicos de cerebros embrionarios provenientes de animales KO Tau (Figura 25B). No existen cambios de los niveles del dímero de la proteína Snapin entre animales WT y KO Tau (Figura 25C), descartando así que esta disminución observada en animales MAP1B $-/-$ sea producto de un aumento en la proporción de microtúbulos axonales desestabilizados.

Una aproximación para determinar la funcionalidad de la proteína Snapin en un contexto fisiológico es el análisis de la interacción entre proteínas que forman parte del

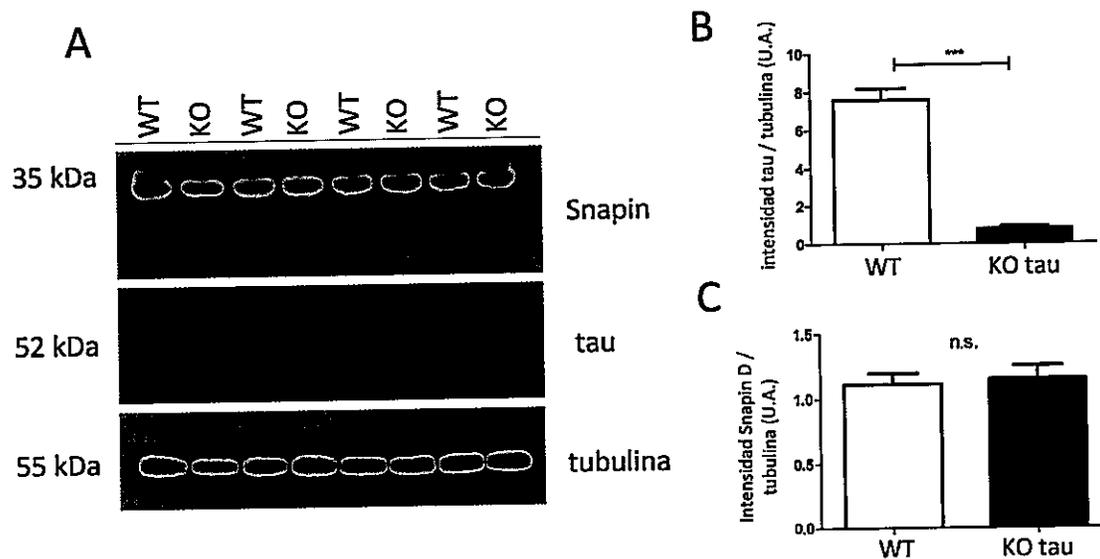


Figura 25. No hay variaciones en el nivel del dímero de Snapin en neuronas KO Tau. (A) *Immunoblot* representativo de la expresión de Snapin y tau a partir de extractos de proteínas de cerebro embrionario de animales WT y KO Tau. Cada condición se muestra por cuadruplicado. 30 μ g de proteínas totales por carril. α -tubulina se utiliza como control de carga. **(B)** Cuantificación de los niveles de Tau en cerebros WT 7.60 ± 0.58 $n=4$, cerebros KO Tau 0.77 ± 0.14 $n=4$. **(C)** Cuantificación niveles de Snapin en cerebros WT 1.12 ± 0.08 $n=4$, cerebros KO Tau 1.15 ± 0.11 $n=4$.

complejo de exocitosis mediada por calcio. Con este propósito se decidió clonar la proteína de fusión GST-SNAP-25 para realizar ensayos de interacción mediante *Pulldown* (Figura 5). No existe interacción específica de la proteína Snapin y Synaptotagmin I con la proteína purificada GST (Figura 26A panel izquierda). Debido a la disminución en los niveles del dímero de Snapin, se observa una reducción en la interacción neta de Snapin con SNAP-25 (Figura 26A panel derecha), lo que cuantitativamente se traduce en una reducción de un 68.81% en cerebros E18.5 provenientes de animales MAP1B $-/-$ en comparación al contexto WT (Figura 26B). Cabe destacar que en etapas embrionarias no se detecta interacción entre las proteínas Synaptotagmin I y GST-SNAP-25 mediante la técnica de *pulldown*, ni en cerebros WT ni MAP1B

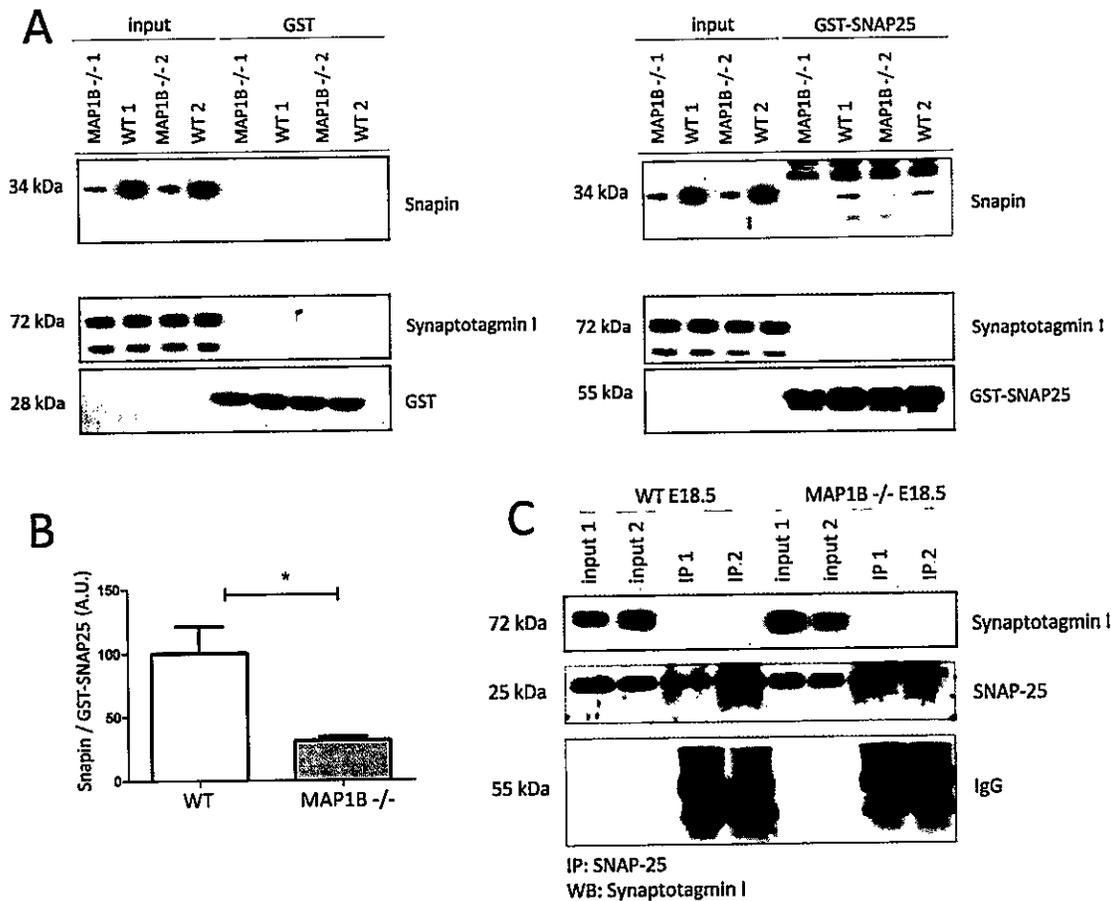


Figura 26. Se observa una disminución en la interacción entre Snapin y el aparato de neurosecreción en cerebros MAP1B^{-/-}. **(A)** *Inmunoblot* representativo de *pulldown* utilizando la proteína purificada e inmovilizada GST-SNAP-25 contra extracto protéico de cerebro de ratones en etapa embrionaria E18.5 WT y MAP1B^{-/-}. Panel de la izquierda corresponde a control negativo de interacción, llevado a cabo con la proteína purificada GST. Panel de la derecha corresponde al *pulldown* utilizando GST-SNAP-25. *Input* corresponde al 3% de carga respecto a ensayos de *pulldown*. Ensayos para cada genotipo se muestran por duplicado. **(B)** Cuantificación de la interacción neta de Snapin con GST-SNAP-25. Interacción en cerebros WT es de 100.0 ± 21.18 $n=3$, y en MAP1B^{-/-} 31.19 ± 2.81 $n=3$. Valor de interacción se obtiene del cociente entre la intensidad de señal de Snapin sobre la intensidad de señal de GST-SNAP-25. T-test $p < 0.01$ **(C)** *Inmunoblot* de ensayo de inmunoprecipitación a partir de cerebros embrionarios E.18.5 utilizando el anticuerpo contra la proteína SNAP-25 y revelando contra Synaptotagmin I. *Input* corresponde al 3% de carga respecto a ensayos de inmunoprecipitación. Ensayos para cada genotipo se muestran por duplicado.

-/- (Figura 26A panel derecha), fenómeno que se replica al analizar la interacción entre estas dos proteínas mediante inmunoprecipitación a partir de cerebros embrionarios WT y MAP1B -/- (Figura 26C). Es por esto que no se utiliza como parámetro de comparación la interacción de entre Synaptotagmin I y SNAP-25 en etapas embrionarias, entre los contextos genéticos WT y MAP1B -/-.

Con el propósito de determinar si MAP1B regula la interacción entre Snapin y SNAP-25 sin alterar los niveles de estas proteínas, se realizaron ensayos de *pulldown* en sistema de expresión heterólogo. Células COS7 fueron co-transfectadas con los vectores codificantes para las proteínas recombinantes Snapin más la cadena liviana de MAP1B (LC1) o con Snapin más la proteína fluorescente verde (GFP). Células COS7 expresan LC1 recombinante al ser detectada contra el epítipo myc (Figura 27A). De igual manera, ambos conjuntos experimentales expresan la proteína Snapin recombinante al ser revelada contra el epítipo FLAG (Inputs Figura 27B). No se observan cambios en la interacción de Snapin con la proteína GST-SNAP-25 en ausencia o presencia de LC1 recombinante (Figura 27B), lo que se traduce en que no existen cambios estadísticamente significativos en la interacción de ambas proteínas (Figura 27C). Es entonces la pérdida de función de MAP1B en consecuencia la que genera una pérdida de función de la proteína Snapin. Con la finalidad de revertir la pérdida de función de Snapin en neuronas MAP1B -/- se sobreexpresó Snapin recombinante mediante transfección transiente en neuronas MAP1B -/- 13 DIV, y se evaluó el número de terminales presinápticos huérfanos presentes en neuronas MAP1B -/- transfectadas con Snapin-FLAG en comparación a los valores de neuronas sin transfectar tanto WT como MAP1B -/-. Axones de neuronas MAP1B -/- transfectadas con Snapin FLAG establecen contacto entre terminales presinápticos positivos para Synaptophysin I y compartimento somato-dendrítico positivo para MAP2 (Figura 28A).

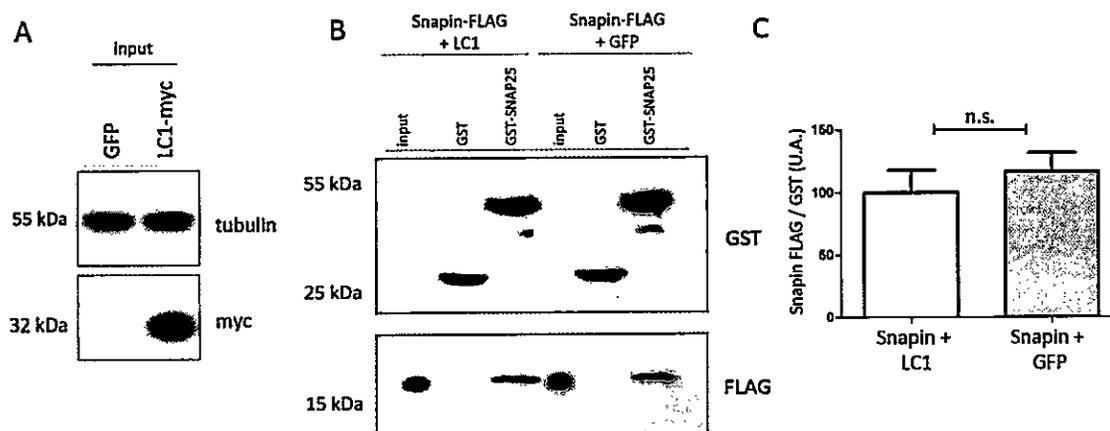


Figura 27. LC1 no promueve la interacción entre Snapin y GST-SNAP-25 en sistema de expresión heterólogo. (A) *Immunoblot* representativo de la expresión de LC1-myc en extracto de proteínas proveniente de células COS7 co-transfectadas con Snapin-FLAG más GFP o Snapin-FLAG más LC1-myc. 30 μ g de proteína por carril. **(B)** *Immunoblot* representativo de ensayo de *pull-down*, donde se observa en el panel superior los niveles de las proteínas purificadas GST y GST-SNAP-25. Panel inferior muestra los niveles de interacción de Snapin-FLAG para cada ensayo. *Input* corresponde al 3% de carga respecto a ensayos de *pull-down*. **(C)** Cuantificación de los niveles de interacción entre Snapin-FLAG y GST-SNAP-25, en donde células COS7 transfectadas con LC1-myc presentan un nivel de interacción de 100.0 ± 17.77 u.a. $n=6$, y células COS7 transfectadas con GFP un 116.8 ± 14.52 u.a. $n=6$. Valor de interacción se obtiene del cociente entre la intensidad de señal de Snapin-FLAG sobre la intensidad de señal de GST-SNAP-25, t-test diferencias no significativas.

Cualitativamente existe una disminución en el número de terminales presinápticos deslocalizados en axones “huérfanos” en neuronas MAP1B $-/-$ transfectadas con Snapin-FLAG en comparación a neuronas sin transfectar (Figura 28B). Neuronas MAP1B $-/-$ Snapin-FLAG muestran 2.97 ± 0.37 terminales huérfanos / 100 μ m, mientras que neuronas MAP1B $-/-$ sin transfectar 5.50 ± 0.53 terminales huérfanos / 100 μ m. Neuronas WT presentan 3.03 ± 0.66 terminales huérfanos / 100 μ m, valor similar al obtenido en neuronas que recuperan la expresión de Snapin, con lo que se concluye que la sobreexpresión de Snapin recupera el fenotipo de terminales presinápticos huérfanos observado en neuronas MAP1B $-/-$.

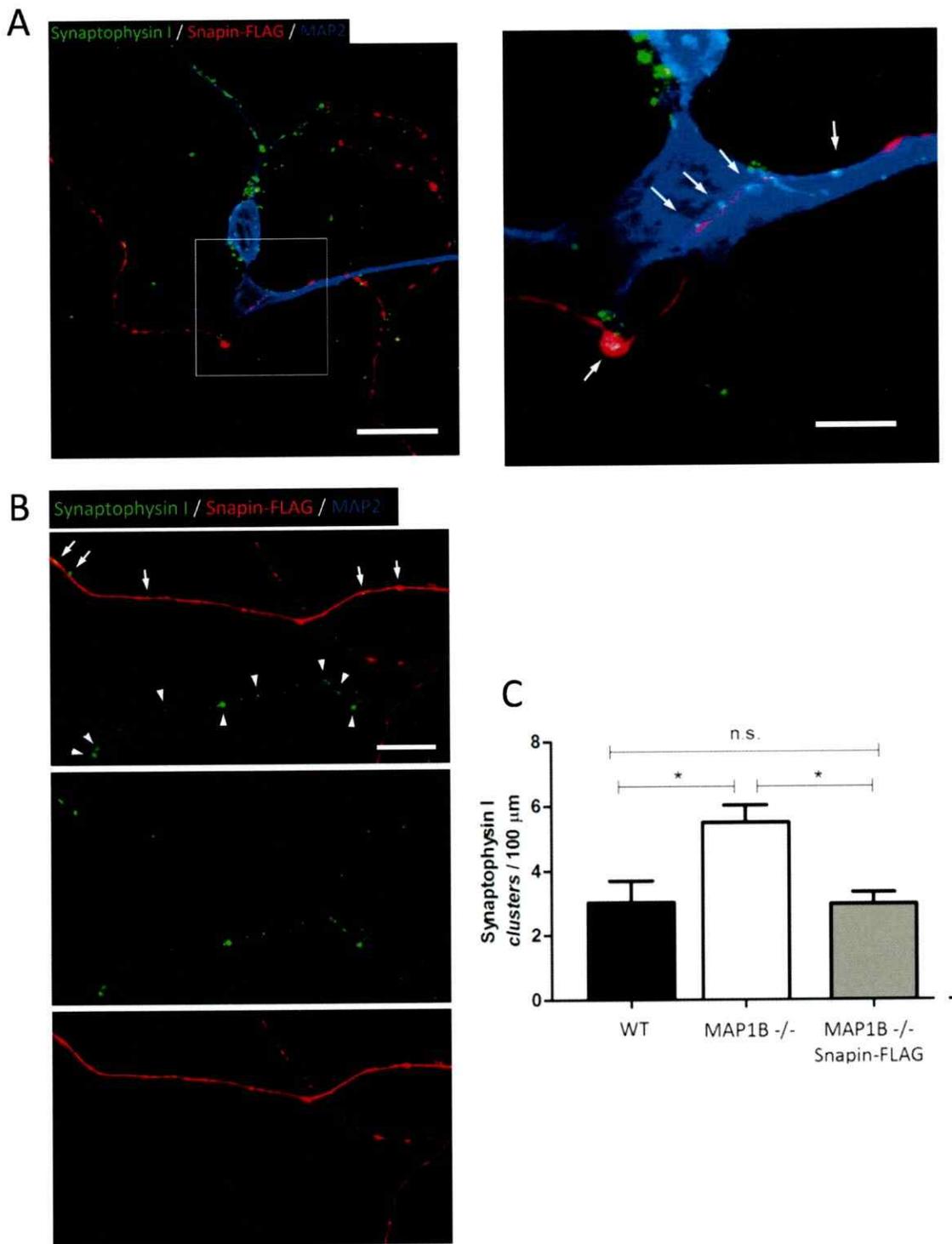


Figura 28. La sobreexpresión de Snapin en neuronas MAP1B $-/-$ revierte el fenotipo de terminales presinápticos huérfanos. **(A)** Imagen de inmunocitoquímica de neuronas MAP1B $-/-$ de 13 DIV, donde se aprecia que neuronas que sobreexpresan la proteína Snapin-FLAG establecen contacto de terminales presinápticos positivos para Synaptophysin I con dendritas

(flechas blancas en *inset*). Barra de tamaño panel izquierda 20 μm , barra de tamaño panel derecha 10 μm **(B)** Inmunocitoquímica de neuronas MAP1B $-/-$ 13 DIV sobre axones que no contactan dendritas. Se observan terminales presinápticos deslocalizados en neuronas que sobreexpresan Snapin-FLAG con flechas, y terminales presinápticos deslocalizados en neuronas no transfectadas con cabezas de flecha. Barra de tamaño 10 μm . **(C)** Cuantificación de terminales presinápticos deslocalizados. Neuronas MAP1B $-/-$ transfectadas con Snapin-FLAG 2.97 ± 0.37 clusters de Synaptophysin I / 100 μm n=6; neuronas MAP1B $-/-$ no transfectadas 5.50 ± 0.53 clusters de Synaptophysin I / 100 μm n=6; neuronas WT sin transfectar 3.03 ± 0.66 clusters de Synaptophysin I / 100 μm n=6. ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, $p < 0.05$ de significancia donde se indica.

DISCUSIÓN

Detección de MAP1B en compartimento axonal en neuronas maduras.

MAP1B ha sido descrita y caracterizada como la primera MAP en expresarse durante el desarrollo temprano del sistema nervioso central, alcanzando un máximo de expresión durante esta etapa para posteriormente decaer durante la adultez (Riederer y col., 1986 y Tucker y col., 1989). Durante los últimos años se ha determinado que la expresión de MAP1B persiste en etapa adulta y en neuronas maduras *in vitro*, donde se encuentra presente en un pequeño porcentaje de espinas dendríticas, regulando su estructura y morfología (Tortosa y col., 2011). En el presente trabajo se determinó mediante inmunofluorescencia que MAP1B se expresa a lo largo del axón en neuronas WT de 21 DIV, como también en el cuerpo dendrítico y soma. Si bien la señal de MAP1B es detectable en axones, no se observó enriquecimiento de esta proteína en terminales presinápticos positivos para Synaptophysin I mediante inmunocitoquímica, sin embargo trabajo realizado previamente en nuestro laboratorio determinó la presencia de MAP1B en fracciones sinaptosomales presinápticas adultas, lo que permitiría concluir que la determinación de la localización subcelular específica de una proteína es relativa a la técnica utilizada. En este caso en particular, una aproximación para evaluar la presencia de MAP1B en terminales presinápticos sería el análisis de la ultra estructura acoplado a *immunogold* contra MAP1B, técnica que otorgaría una resolución espacial detallada de la presencia de esta proteína en el terminal presináptico. Finalmente, es necesario mencionar que si bien existen antecedentes que dan cuenta de la presencia de MT en terminales presinápticos mediante microscopía electrónica, la reproducibilidad de los resultados depende del protocolo

seguido para la fijación y tinción de las muestras. En este contexto se ha propuesto que las dificultades técnicas para la detección de MT presinápticos radican probablemente en que las ondas de calcio transientes asociadas a la exocitosis de neurotransmisores en terminales presinápticos, causan la despolimerización de MT en condiciones fisiológicas (Gray y col., 1982; Harris y Weinberg 2012). Si la presencia de MAP1B en terminales presinápticos depende de su asociación con MT, un análisis de ultra estructura acoplado a *immunoglod* se debiese realizar con las consideraciones necesarias para promover la estabilidad de los MT presinápticos. Por otro lado, no se puede descartar que la presencia de MT en terminales presinápticos sea transitoria y dependiente de actividad sináptica, tal como ocurre con MT post-sinápticos (Hu y col., 2008; Jaworski y col., 2009), y por lo tanto difícilmente detectable mediante análisis de microscopía electrónica. Una posibilidad para solventar este problema sería monitorear la dinámica de tubulina fusionada a una proteína fluorescente en terminales presinápticos a través de microscopía confocal y *live cell imaging*.

El aumento en la proporción de terminales presinápticos huérfanos en neuronas MAP1B -/- se puede atribuir a una capacidad reducida de generar contactos sinápticos

El fenómeno de sinaptogénesis contempla múltiples etapas, las que abarcan desde una primera interacción axo-dendrítica hasta la consolidación de un contacto sináptico maduro. Actualmente existe la noción de que tanto terminales presinápticos como terminales postsinápticos pueden emerger de manera autónoma previo a que exista contacto entre el axón y la dendrita. Con respecto al componente presináptico, está ampliamente descrito que componentes protéicos estructurales de la zona activa y *clusters* de vesículas sinápticas

capaces de liberar neurotransmisores en respuesta a estímulos eléctricos, se encuentran preensamblados, sin una contraparte postsináptica, y que se desplazan a través del axón de manera altamente dinámica (Zhai y col., 2001 y Ziv y Garner 2004). Estos “paquetes” de terminales presinápticos, llamados también terminales presinápticos huérfanos, son funcionales, sin embargo son más pequeños y presentan una probabilidad de liberación de neurotransmisores disminuida respecto a un terminal presináptico que forma sinapsis (Krueger y col., 2003). Acorde con esto, desde un punto de vista temporal se ha determinado que en la mayoría de los contactos sinápticos *in vitro*, la formación del terminal presináptico precede al establecimiento de un terminal postsináptico funcional (Friedman y col., 2000). A partir de nuestros resultados, se observa un aumento en la proporción de terminales presinápticos huérfanos en neuronas MAP1B *-/-* maduras (Figura 29A), lo que se puede atribuir a la deficiencia en la conformación dimérica de la proteína Snapin, tal como se ha demostrado ocurre con la disminución de otras proteínas sinápticas. Por ejemplo, neuronas que presentan expresión disminuida de la proteína presináptica Synaptotagmin I, muestran un aumento en la proporción de terminales presinápticos huérfanos *in vitro* (Yamada y col., 2013). De igual modo, animales deficientes para la proteasa Neuropsin, involucrada en fenómenos de plasticidad neuronal dependiente de actividad, presentan un mayor número de terminales presinápticos huérfanos (Nakamura y col., 2006). Los mecanismos de generación y mantención de terminales huérfanos no han sido determinados, sin embargo parece ser que al regular negativamente la liberación de neurotransmisores desde terminales presinápticos, no se logra establecer y consolidar un contacto sináptico maduro a partir de un terminal presináptico huérfano.

Se ha descrito que en cultivo de neuronas hipocampales WT maduras, aproximadamente un 65% de los terminales presinápticos detectados se encuentran en contacto directo con una dendrita MAP2 positiva, mientras que el 35% restante correspondería a terminales presinápticos huérfanos (Krueger y col., 2003). En nuestros cultivos observamos que neuronas WT de 21 DIV, alrededor de un 79% de los terminales presinápticos se encuentra yuxtapuesto a una dendrita. Este aumento en la proporción de estos terminales presinápticos en comparación a lo descrito en la literatura se puede deber a que el análisis se realizó a distintos tiempos de cultivo, puesto que a medida que el cultivo madura, el ensamblaje de terminales presinápticos huérfanos se suprime (Yamada y col., 2013). Esta deslocalización en terminales presinápticos positivos para Synaptophysin I no se relaciona con cambios en la masa de esta proteína ni en etapas embrionarias ni en etapas adultas en neuronas MAP1B $-/-$ en comparación a neuronas WT. Este fenómeno se ha observado en neuronas KO para la kinesina KIF1A, las que presentan una disminución en el número de contactos sinápticos, sin existir cambios en la masa de las proteínas presinápticas Synaptophysin I y SV2 (Yonekawa y col., 1998). Un fenotipo similar se observa en neuronas en las que se inhibe la expresión de la proteína Ankyrin G, componente estructural clave del segmento inicial del axón encargado de mantener la polaridad neuronal en neuronas maduras, donde existe una relocalización de proteínas sinápticas sin existir cambios aparentes en su masa (Hedstrom y col., 2008 y Sobotzik y col., 2009). Por otro lado, neuronas triple *knockout* para las proteínas Synapsin I, II y III (Synapsin TKO), exhiben una deslocalización y un patrón de expresión espacial difuso de proteínas presentes en vesículas sinápticas, a lo largo del cuerpo axonal (Fornasiero y col., 2012). Si bien en este trabajo se evaluó la deslocalización de terminales presinápticos, no se

puede descartar que exista expresión ectópica de Synaptophysin I en regiones neuronales que no hayan sido analizadas mediante los protocolos de reconstrucción.

Otra posibilidad es que MAP1B se encuentre formando un *link* estructural entre en citoesqueleto de actina y los microtúbulos en la periferia de terminales presinápticos, permitiendo la translocación de componentes estructurales de terminales presinápticos, desde el *shaft* axonal rico en microtúbulos hacia el terminal presináptico enriquecido en actina (Hirokawa y col., 1989). La deficiencia de MAP1B no permitiría entonces suplir los componentes necesarios para establecer y mantener un terminal presináptico capaz de madurar y generar de esta manera un contacto sináptico.

Una explicación bioquímica a la detección del dímero de Snapin.

Snapin se registró y caracterizó por primera vez como una proteína que presenta un peso molecular calculado de aproximadamente 15 kDa (Ilardi y col., 1999). Sin embargo se ha descrito que la proteína Snapin recombinante purificada es capaz de formar homo-dímeros estables en condiciones *in vitro* (Vites y col., 2004), y que esta conformación dimérica es la que ejerce el rol fisiológico de potenciar la interacción entre SNAP-25 y Synaptotagmin I, de manera más eficiente que la conformación monomérica (Pan y col., 2009). Snapin homo-dímero se forma mediante una interacción covalente a través del enlace disulfuro generado por el único residuo cisteína (Cys66) presente en la estructura primaria de la proteína Snapin, y mutaciones puntuales que reemplazan la cisteína 66 por un aminoácido no oxidable previenen la formación del dímero de Snapin recombinante en ensayos *in vitro* (Pan y col., 2009 y Navarro y col., 2012). En nuestro modelo experimental, la proteína Snapin endógena es detectada en su

conformación de monómero y dímero (aproximadamente 17 y 34 kDa respectivamente), prevaleciendo la expresión del dímero, tanto en neuroblastomas como en tejido neuronal. Ensayos de *knockdown* utilizando shRNAs específicos contra la proteína Snapin disminuyen la masa de la proteína en su conformación de dímero y no así el monómero. Sin embargo, cabe destacar que al sobreexpresar Snapin *full length* recombinante en líneas celulares, solo se detecta Snapin en su forma monomérica. Considerando que para el protocolo de SDS-PAGE, la muestras de proteínas son denaturadas en condiciones reductoras (buffer de carga que contiene DTT o β -mercaptoetanol (β -Me)), una posible interpretación para la prevalencia de Snapin endógena en su forma dimérica es que esta conformación se establezca a través de un enlace disulfuro resistente a agentes reductores, fenómeno que se ha descrito ocurre en otras proteínas que forman estructuras diméricas a través de enlaces disulfuros DTT-resistentes (Karasawa y col., 2010 y Regeer y col., 2007) o β -Me-resistentes (Zhu y col., 2014). En concordancia con lo ya expuesto, se ha reportado la existencia de dímeros de la proteína iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) resistentes a agentes reductores denominados *Undisruptable Dimers*, los que aparte de no ser sensibles a DTT ni SDS, solo pueden dimerizar en condiciones endógenas, y no así *in vitro*, lo que sugiere que procesos biológicos activos en células eucariontes son necesarios para la formación de dicha conformación dimérica (Kolodziejcki y col., 2003). Otra posibilidad es que la prevalencia del dímero de Snapin en condiciones reductoras, se deba a interacciones no covalentes entre monómeros de Snapin, tal como se ha observado por ejemplo para la proteína Tau, la que es capaz de dimerizar de manera dependiente o independiente de enlaces disulfuros (Sahara y col., 2007). En relación a esto se ha demostrado *in vitro* que la mutación del aminoácido cisteína 66 en Snapin recombinante no impide la formación de oligómeros de Snapin recombinante a través de interacciones

hidrofóbicas (Navarro y col., 2012), es más, proteínas SNARE, incluyendo a SNAP-25, que participan en la exocitosis de neurotransmisores mediada por calcio, también forman heterooligómeros detectables mediante *immunoblot* (Hayashi y col., 1994 y O'Connor y col., 1997). Que Snapin forme dímeros o estructuras oligoméricas estables que interactúen no covalentemente es una posibilidad, puesto que Snapin en su región carboxilo-terminal posee una agrupación de aminoácidos básicos, que podrían exponer superficies hidrofóbicas como lo sugiere el alto *score* otorgado a este dominio para la formación de *coiled coils* (Vites y col., 2004). También se ha observado mediante *immunoblot* de extractos de proteínas de cerebro y células PC12, que utilizando anticuerpos no comerciales específicos contra Snapin, se detectan bandas a aproximadamente 35 kDa y a pesos moleculares mayores (Vites y col., 2004 y Chen y col., 2005), similar a lo observado en nuestros resultados. Finalmente, tal como se observó en los ensayos de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC), los monómeros de Snapin WT y Snapin C66A son capaces de interactuar entre sí de manera independiente a la formación del enlace disulfuro generado a través del único residuo cisteína 66, lo que sugiere que el fenómeno de dimerización ocurriría a través de una interacción no covalente entre proteínas, tal como se discutió anteriormente.

Neuronas MAP1B $-/-$ presentan una fisiología presináptica alterada

Trabajo no publicado realizado en nuestro laboratorio demostró que neuronas maduras MAP1B $-/-$ presentan un retraso en la cinética de liberación de neurotransmisores, sin presentar alteraciones aparentes en la tasa de neurosecreción. Este fenómeno se podría atribuir a alguna anomalía en el *priming* de vesículas sinápticas (transición funcional desde el

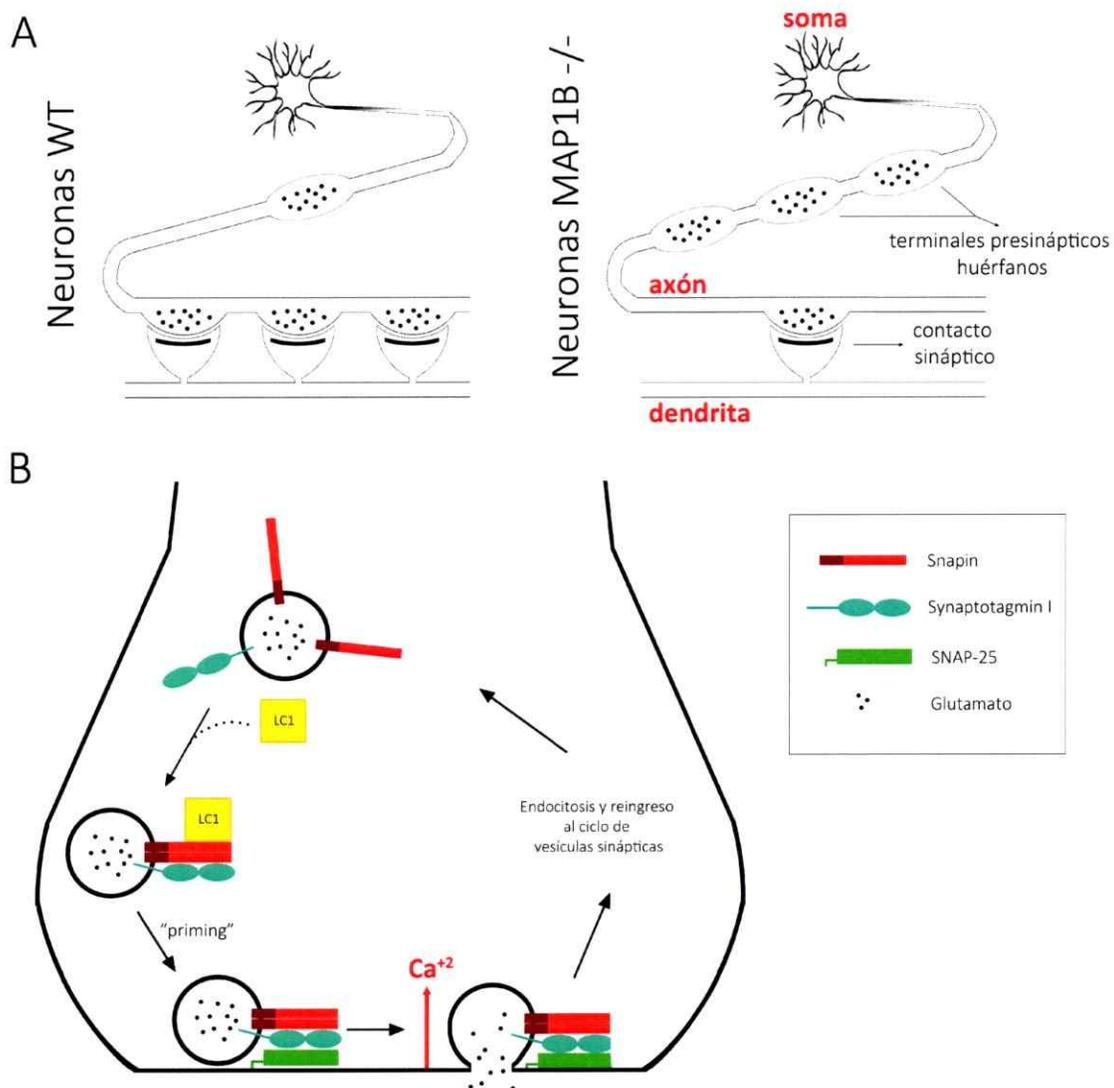


Figura 29. Esquema resumen del fenotipo sináptico en neuronas maduras y posible mecanismo de neurosecreción. (A) Sumario del fenotipo sináptico observado en neuronas maduras, donde se observa el aumento en la proporción de terminales presinápticos huérfanos y la disminución en la cantidad de contactos sinápticos en neuronas MAP1B^{-/-} en comparación a neuronas WT de 21 DIV. **(B)** MAP1B a través de su cadena liviana LC1 promovería la conformación dimérica de Snapin, que ejerce su rol fisiológico de potenciar la interacción entre Synaptotagmin I y SNAP-25 que determina el posicionamiento de la vesícula sináptica en la zona activa, previo al ingreso de calcio extracelular en respuesta al potencial de acción entrante, fenómeno en donde MAP1B regularía la temporalidad de la liberación de neurotransmisores.

estado *docked* hacia vesículas listas para ser liberadas) previo a la entrada de calcio extracelular. En este contexto se ha determinado que Synaptotagmin I y SNAP-25 pueden interactuar en ausencia de Ca^{+2} en terminales presinápticos, regulando el *priming* de vesículas sinápticas en la zona activa, previo al aumento local en la concentración de Ca^{+2} producido por la llegada de un potencial de acción al terminal nervioso (Rickman y Davletov, 2003 y Pan y col., 2009). Se ha determinado que el fenómeno de ensamblaje de la maquinaria SNARE durante el *priming* es el paso limitante para la neurosecreción en neuronas glutamatérgicas (Brose y col., 2000 y Rettig y Neher, 2002). En este contexto MAP1B a través de su cadena liviana LC1 promovería la conformación dimérica de Snapin, siendo este dímero el que aumenta la interacción entre los componentes del aparato de neurosecreción. El dímero de Snapin potenciaría la interacción entre SNAP-25 y Synaptotagmin I previo al ingreso de calcio desde el medio extracelular, determinando de esta manera la disponibilidad de las vesículas sinápticas para ser liberadas, y regulando directamente la temporalidad del evento de fusión de membranas y de liberación de neurotransmisores (Figura 29B). La ausencia del dímero de Snapin en neuronas MAP1B $-/-$ provocaría de esta manera una disminución en la cantidad de vesículas sinápticas que se encuentran en estado *primed* listas para ser liberadas, lo que resultaría un retraso en la exocitosis de neurotransmisores. Esto podría también explicar el fenómeno fisiológico observado en neuronas MAP1B $-/-$ maduras, donde existe una reducción en la amplitud y en la frecuencia de mEPSC respecto a neuronas WT (Tortosa y col., 2011), dando cuenta de una disminución en el número de vesículas sinápticas disponibles para ser liberadas. Es necesario mencionar que la interacción entre Synaptotagmin I y SNAP-25 también es dependiente de Ca^{+2} , y es esta asociación la que promueve la fusión de vesículas sinápticas y

consecuentemente la liberación de neurotransmisores (Zhang y col., 2002), por ende existen otros parámetros fisiológicos que podrían ser analizados en neuronas MAP1B $-/-$ para entender mejor las deficiencias a nivel presináptico. Por ejemplo, neuronas KO para Snapin pierden la sincronización de la exocitosis de neurotransmisores, siendo este un parámetro que no se puede evaluar mediante el ensayo de fluorescencia utilizando la sonda FM4-64. Si bien se ha demostrado que en rebanadas de hipocampo de animales MAP1B $+/-$ no hay alteraciones en la componente presináptica al ser analizado mediante ensayos de facilitación por pulsos pareados (*paired-pulse facilitation*, PPF) (Benoist y col., 2013), esto se debe probablemente a que un 50% de la dosis de MAP1B parece ser suficiente para ejecutar de manera normal la función presináptica. Consistente con este hallazgo, en esta tesis hemos descrito que una pérdida de función del 50% de MAP1B (animales heterocigotos) no induce una reducción significativa en la cantidad del dímero de Snapin. Es por esto que para análisis profundo de parámetros electrofisiológicos se propone realizar ensayos de facilitación por pulsos pareados en neuronas maduras disociadas WT y MAP1B $-/-$.

Si bien en neuronas de mamífero se ha descrito que al alterar la dinámica del citoesqueleto de actina presináptico, existen variaciones en la cinética de liberación de neurotransmisores (Morales y col., 2000 y Colicos y col., 2001), no existen antecedentes que den cuenta de una regulación directa del citoesqueleto de microtúbulos sobre la dinámica de liberación de neurotransmisores, lo que plantea poco probable que el fenotipo de retraso en la neurosecreción observado en neuronas MAP1B $-/-$ se deba a una desestabilización en el citoesqueleto de microtúbulos.

Existe un fenotipo sináptico inmaduro en neuronas MAP1B deficientes

In vitro, un contacto sináptico asimétrico, formado entre un terminal presináptico y el *shaft* dendrítico puede corresponder a una sinapsis excitatoria inmadura o a una sinapsis inhibitoria. Se ha descrito que en hipocampo embrionario de murinos, entre un 85 – 90% de las neuronas son piramidales excitatorias de naturaleza glutamatérgica, siendo el porcentaje restante interneuronas inhibitorias, principalmente GABAérgicas. Esta característica se replica *in vitro*, donde cultivos primarios de neuronas hipocampales embrionarias realizados siguiendo el mismo protocolo que el utilizado en este trabajo, presentan en promedio aproximadamente un 6% de prevalencia de neuronas inhibitorias (Benson y col., 1994). En base a esto, siguiendo un protocolo similar se esperara obtener un cultivo neuronal representado en su gran mayoría por contactos sinápticos excitatorios. Sin embargo, para hacer hincapié en este punto se decidió analizar un parámetro morfológico de vesículas sinápticas utilizado para evaluar la naturaleza neuroquímica de un contacto sináptico. Específicamente se ha descrito que las vesículas sinápticas presentes en sinapsis inhibitorias presentan una morfología pleomórfica no simétrica en comparación a vesículas sinápticas excitatorias, al ser analizadas mediante microscopía electrónica (Chaudhry y col., 1998 y Dumoulin y col., 1999). Es por esto que se evaluó la elipticidad de las vesículas sinápticas como un factor de simetría. No existen cambios en la elipticidad de vesículas sinápticas, ni al comparar entre ambos tipos de contactos sinápticos, ni entre neuronas WT y MAP1B $-/-$. Por ende las vesículas sinápticas presentes tanto en sinapsis axón-espina y axón-*shaft* son altamente simétricas independiente del genotipo analizado. Esto sumado al hecho de que el diámetro registrado para vesículas sinápticas se ajusta al valor descrito en la literatura para vesículas sinápticas en sinapsis excitatorias, aproximadamente 40 nm de diámetro (Südhof y Rizo, 2011), permite proponer

que las sinapsis axón-*shaft* analizadas corresponderían a sinapsis excitatorias inmaduras en lugar de sinapsis inhibitorias. Reforzando esta idea, en cultivo de neuronas hipocampales WT 21 DIV, alrededor de un 50% de las sinapsis excitatorias ocurren entre el axón y el *shaft* dendrítico, porcentaje similar al obtenido con nuestro análisis. Finalmente, para complementar esta observación sería necesario realizar inmunocitoquímica sobre neuronas WT y MAP1B -/- utilizando un marcador presináptico de sinapsis inhibitorias, como por ejemplo vGAT o el transportador de glicina (*glycine transporter 2*, GlyT2), o un receptor postsináptico de neurotransmisores inhibitorios, como por ejemplo GlyR.

Mediante la caracterización estructural basada en ensayos de microscopía electrónica e inmunofluorescencia de contactos sinápticos tanto *in vivo* como *in vitro*, se han propuesto distintos modelos de maduración sináptica. Por ejemplo, en el modelo planteado por Miller y Peters se propone que los contactos sinápticos del tipo axón-*shaft* corresponderían a sinapsis excitatorias inmaduras, que preceden la formación de una espina dendrítica madura. Esta espina dendrítica emerge directamente desde el *shaft* dendrítico, toma el material postsináptico pre-existente ahí ensamblado, y lo lleva consigo a medida que se extiende hacia su contraparte presináptica (Miller y Peters, 1981 y Yuste y Bonhoeffer., 2004) (Figura 30A). El modelo desarrollado por Constantino Sotelo se basa en observaciones realizadas en células de Purkinje del cerebelo de ratones, y propone que el desarrollo de una espina dendrítica madura es un fenómeno intrínseco e independiente de la presencia de una terminal presináptico (Sotelo 1978 y Yuste y Bonhoeffer., 2004) (Figura 30B). La maduración de espinas dendríticas previo al establecimiento sináptico ha sido observado también *in vivo* en regiones corticales del cerebro de ratón (Knott y col., 2006). El modelo filopodial puede interpretarse de dos formas, la primera se basa en la hipótesis sinaptotrófica propuesta por Vaughn y postula que un

filopodio dendrítico al encontrar un terminal presináptico es capaz de “llevar” esta estructura hacia el cuerpo dendrítico, generando así una sinapsis axón-*shaft* que posteriormente madurará siguiendo el modelo de Miller y Peters (Vaughn 1989 y Yuste y Bonhoeffer., 2004). Una segunda lectura de este modelo propone que un filopodio puede madurar directamente en una espina dendrítica al establecer contacto con un terminal presináptico, tal como se esquematiza en la Figura 30C. Finalmente está el modelo de templado sináptico, en donde una sinapsis axón-*shaft* se considera como inmadura, ya que servirá como templado o sitio cebador para la formación de un filopodio que finalmente madurará a una espina dendrítica, siguiendo el modelo filopodial (Figura 30D). Según este modelo, la actividad sináptica en los contactos axón-*shaft* generaría un aumento en la concentración local de factores que promueven la formación de filopodios, como el glutamato e iones de calcio (Reilly y col., 2011). Es relevante destacar que nuestros resultados basados en el análisis de la densidad sináptica mediante microscopía electrónica indican que en neuronas WT de 21 DIV un 57.89% de los contactos sinápticos son generados entre un terminal presináptico y una espina dendrítica, mientras que un 42.11% corresponde a sinapsis axón-*shaft*. Este dato se ajusta con lo descrito en la literatura, donde la proporción de contactos sinápticos axón-espina y axón-*shaft* es similar en cultivo de neuronas hipocampales WT, con aproximadamente 50% de prevalencia para cada caso, porcentaje que se mantiene constante a medida que el cultivo madura (Boyer y col., 1998). Esta proporción descrita en la literatura de sinapsis inmaduras del tipo axón-*shaft in vitro* es elevado en comparación a lo que se observa *in vivo*, principalmente debido a que en cultivo no se consolidan redes neuronales que potencien y produzcan la maduración estructural de contactos sinápticos, sino que existe un proceso constante de formación, maduración y eliminación sináptica (Boyer y col., 1998). Sin embargo, esta proporción

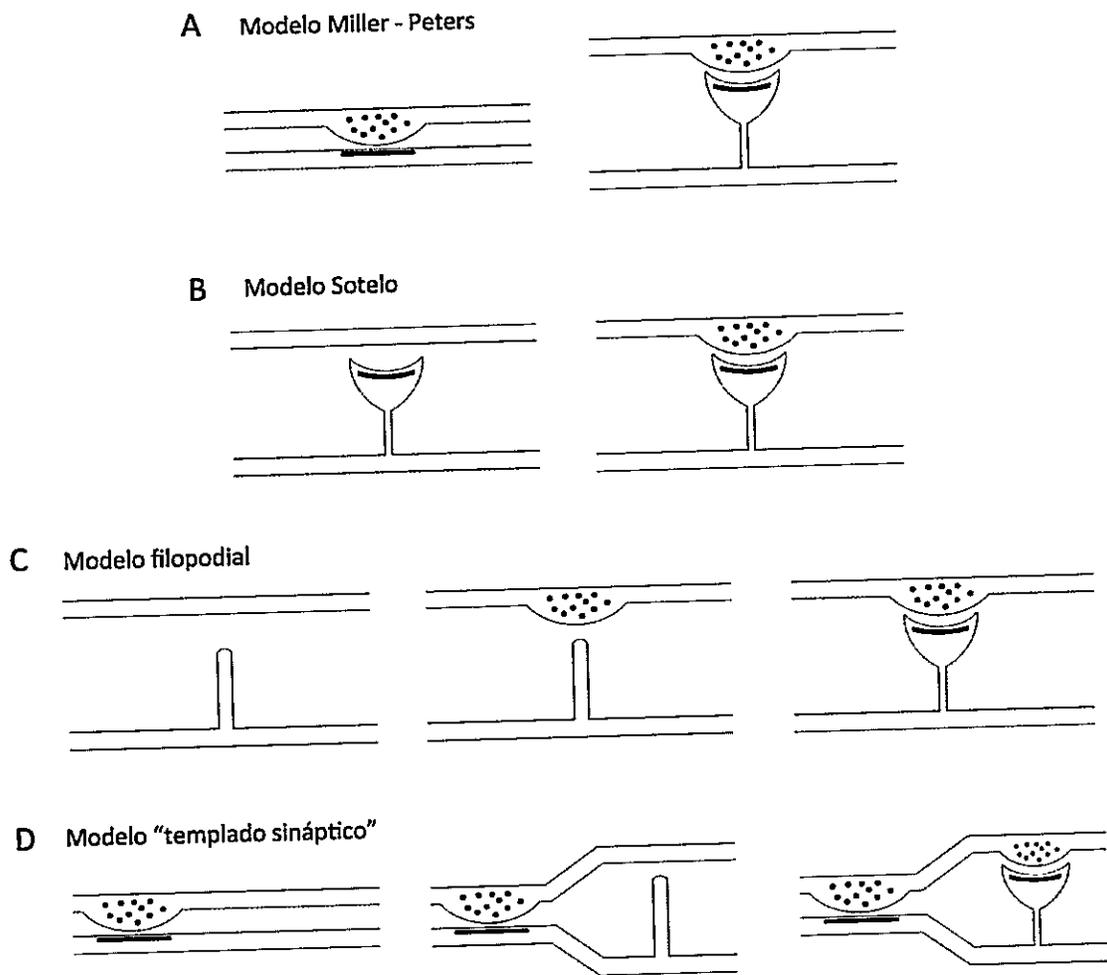


Figura 30. Modelos de maduración sináptica. (A) Modelo de Miller-Peters, donde una sinapsis axón-*shaft* da paso a una espina dendrítica. (B) Modelo de Sotelo. La maduración sináptica es un proceso independiente de la presencia de un terminal presináptico. (C) Modelo filopodial. Un filopodio en contacto con un terminal axonal, madura hacia una espina dendrítica. (D) Modelo de "templado sináptico". Una región adyacente a un contacto axón-*shaft*, dará lugar a la formación de una contacto sináptico maduro.

entre contactos sinápticos maduros e inmaduros *in vitro* guarda directa relación con la confluencia del cultivo neuronal, donde a mayor densidad neuronal, mayor proporción de contactos sinápticos maduros del tipo axón-espina se observarán en el cultivo (Ivenshitz y

Segal, 2010). Los procesos de sinaptogénesis y maduración sináptica, difícilmente puedan ser explicados en base a un solo mecanismo, sino que lo más probable es que los fenómenos descritos en los modelos recién presentados no sean excluyentes y ocurran en forma paralela. Neuronas deficientes para MAP1B presentan un aumento en la proporción de contactos axón-*shaft* que corresponderían a contactos sinápticos inmaduros. Nuestro análisis permite postular que la carencia de MAP1B afectaría los procesos de maduración sináptica en los que se requiere un terminal presináptico para la maduración de su contra parte postsináptica, como propone el modelo de Millers-Peters o el modelo de templado sináptico. Concordante con esto, el aumento en la proporción de terminales presinápticos huérfanos y la disminución en la densidad sináptica en neuronas MAP1B *-/-* sugiere un mecanismo en el que alteraciones en el terminal presináptico afecta el establecimiento y mantención de contactos sinápticos.

En el presente trabajo se determinó que si bien no existen alteraciones en el área de terminales presinápticos de neuronas MAP1B *-/-*, estos presentan una disminución en la densidad de vesículas sinápticas totales, lo que corresponde a un fenotipo característico de terminales presinápticos con una fisiología aberrante o inmadura (Mozhayeva y col., 2002). Esta morfología fenocopia a lo observado en neuronas corticales KO para Snapin (Pan y col., 2009) y neuronas deficientes para otras proteínas presinápticas, lo que se relaciona con una función presináptica deficiente. También existe disminución en la densidad de vesículas de núcleo denso (DVC). En la literatura se ha descrito que *in vitro* vesículas de núcleo denso de gran tamaño (100-200 nm) almacenan neuropéptidos, factores de crecimiento y ciertos neurotransmisores, y que vesículas de núcleo denso de menor tamaño (<100 nm) contienen componentes de la zona activa presináptica pre-ensamblados (Torrealba y Carrasco 2005, y Sorra y col., 2006). Este último grupo de DCVs recibe el nombre de vesículas de transporte de

Piccolo-Bassoon (*Piccolo-Bassoon transport vesicles*, PTVs), y se caracterizan por ser de aproximadamente 80 nm de diámetro y por encontrarse en baja frecuencia en terminales presinápticos de neuronas hipocampales (Sorra y col., 2006 y Zhai y col., 2001). A estos elementos vesiculares se les ha atribuido un rol fundamental en el fenómeno de sinaptogénesis y maduración sináptica, puesto que transportan componentes fundamentales para la función presinápticos, como las proteínas Piccolo, Bassoon, Syntaxin y SNAP-25 (Zhai y col., 2001 y Shepira y cols, 2003). Las vesículas de núcleo denso que encontramos en nuestros cultivos se ajustan a la descripción morfológica de PTVs. La disminución de PTVs en neuronas MAP1B *-/-* se relacionan también con un fenómeno de sinaptogénesis y maduración sináptica alterado. Un contacto sináptico inmaduro o un terminal presináptico huérfano pueden ser funcionalmente activos, sin embargo para consolidar una sinapsis madura se requieren componentes de la citomatrix de la zona activa y del complejo de proteínas SNARE, que son transportados por PTVs, por ende, un menor número de estas vesículas da cuenta de un fisiología presináptica anómala

Es relevante destacar que el proceso de sinaptogénesis no se puede concebir sino es en base a la existencia de comunicación bidireccional entre los compartimentos pre y postsinápticos, donde una alteración en la fisiología propia de uno de los dos terminales, evoca una respuesta homeostática en su contraparte. Por ejemplo se ha demostrado que la proteína postsináptica de adhesión celular Neuroligin1 es esencial para la maduración de botones presinápticos en su contraparte axonal (Wittenmayer y col., 2009). La disminución en la densidad sináptica observada en neuronas MAP1B *-/-* es atribuible a la estructura y fisiología presináptica alterada, sin embargo el hecho que neuronas MAP1B *-/-* presenten una disminución en la proporción de espinas dendríticas maduras del tipo *mushroom* (Tortosa y

col., 2011) también permite postular que la estructura presináptica podría estar siendo afectada por la fisiología anormal del terminal postsináptico.

Deficiencia de MAP1B fenocopia la deficiencia de Snapin en terminales presinápticos, lo que se relaciona con la pérdida de función de Snapin en neuronas MAP1B $-/-$.

Neuronas MAP1B $-/-$ presentan una morfología y estructura presináptica que fenocopia en gran medida lo observado en neuronas KO Snapin (Pan y col., 2009), lo que hace suponer que la pérdida de función de Snapin registrada en neuronas MAP1B $-/-$ puede explicar en parte el fenotipo presináptico alterado. Más aún, la sobreexpresión de Snapin en neuronas MAP1B $-/-$, disminuye el número de terminales presinápticos huérfanos, llegando a niveles comparables a los de neuronas WT, permitiendo atribuir a la pérdida de función de Snapin la proporción aumentada de terminales presinápticos deslocalizados observada en neuronas MAP1B $-/-$. De igual manera neuronas MAP1B deficientes presentan una disminución en el número de terminales presinápticos y también en la densidad de contactos sinápticos, fenotipo también observado en neuronas KO para Snapin (Pan y col., 2009). Análisis de la ultra estructura de terminales presinápticos, revelan que neuronas maduras MAP1B $-/-$ presentan una disminución en la densidad de vesículas sinápticas totales, fenotipo similar al observado en neuronas KO Snapin y en neuronas que no expresan otras proteínas que forman parte de terminales presinápticos.

Neuronas MAP1B $-/-$ presentan una disminución en la conformación dimérica de la proteína Snapin. Esta pérdida de función de Snapin es específica para la deficiencia de MAP1B y no se atribuye a una disminución en la estabilidad de microtúbulos, puesto que cerebros

provenientes de animales KO Tau, proteína que estabiliza microtúbulos de manera más eficiente que MAP1B y que se expresa específicamente en axón, no presentan variaciones en los niveles del dímero de Snapin. Una posibilidad es que en el contexto genético carente para MAP1B exista una degradación exacerbada de Snapin que se ve reflejada en la disminución de la forma dimérica de esta proteína, es por esto que con el propósito de analizar un posible mecanismo degradativo en neuronas MAP1B $-/-$ que sea específico para Snapin, se decidió realizar ensayos de inhibición de proteasoma y lisosoma sobre cultivos de neuronas corticales maduras. Se ha descrito que Snapin es poli-ubiquitinada específicamente en la lisina 29, sin embargo esta modificación post-traducciona no induce degradación de la proteína, sino que regula la interacción de Snapin con proteínas SNARE (Zhang y col., 2013). MAP1B también se ha relacionado con el sistema degradativo dependiente de proteasoma, ya que regula la degradación a través de ubiquitinación del canal de calcio sensible a voltaje $Ca_v2.2$ (Gandini y col., 2014). La inhibición del proteasoma se llevó a cabo utilizando el fármaco MG132, y la inhibición de lisosoma se realizó utilizando cloroquina, siguiendo protocolos de inhibición en cultivo de neuronas hipocampales (Altier y col., 2010 y Hamilton y col., 2012). Con el protocolo realizado no se observan variaciones o restablecimiento en los niveles de la conformación dimérica de Snapin en neuronas MAP1B $-/-$ al inhibir la degradación proteasomal o lisosomal (Anexo Figura 5). Esto sugiere fuertemente, que la disminución en los niveles de la unidad funcional de la proteína Snapin observada en neuronas MAP1B $-/-$ no se relaciona con un fenómeno de degradación dependiente de proteasoma o lisosoma. A partir de ese resultado emerge la posibilidad de que MAP1B promueva la dimerización de la proteína Snapin en un contexto fisiológico. Una alternativa es que MAP1B impida la interacción de Snapin con reguladores negativos de su actividad. Por ejemplo, se ha demostrado que la proteína EHD-1

interactúa con Snapin, disminuyendo la asociación de esta última con la maquinaria SNARE y por ende regulando negativamente la neurosecreción (Wei y col., 2010). MAP1B podría desplazar el equilibrio hacia la formación de Snapin dímérico a través de un fenómeno de competencia con EHD-1 o cualquier otro regulador negativo. Otra posibilidad es que MAP1B actúe como chaperona o como un soporte estructural necesario para la dimerización de Snapin, donde en ausencia de MAP1B los niveles de la conformación de dímero de Snapin se ven drásticamente disminuidos. Sin embargo, no se puede descartar que el hecho de que no se recuperen los niveles del dímero de Snapin en neuronas MAP1B $-/-$ se deba a que las concentraciones de los fármacos utilizadas no fueron las apropiadas, o a que el tiempo de los tratamientos (20 horas para todas las condiciones) no fue suficiente como para inhibir la degradación de la proteína. Sin embargo, no existen estudios que den cuenta del tiempo de vida media y/o estabilidad de la proteína Snapin. Si este fuese el caso, quedaría por analizar de qué manera MAP1B estaría protegiendo de la degradación a la forma dimérica de Snapin en neuronas maduras, ya sea impidiendo la ubiquitinación o promoviendo su des-ubiquitinación. En adición queda por evaluar si existen variaciones a nivel transcripcional de Snapin en el contexto genético deficiente para MAP1B, a través de ensayos de RT-PCR a partir de mRNA total de tejido cerebral.

Como se ha descrito en la última década, MAP1B, a través de su cadena liviana LC1 ejerce múltiples roles no canónicos para una proteína asociada a microtúbulos, a través de la interacción con distintas proteínas (Villarreal-Campos y Gonzalez-Billault, 2014). Los resultados presentados en este trabajo sugieren fuertemente que MAP1B a través de su interacción con Snapin puede regular la estructura y fisiología del terminal presináptico, sin embargo se podría considerar que parte del fenotipo presináptico observado en neuronas MAP1B $-/-$ pueda

explicarse en base a la propiedad de estabilización de microtúbulos que posee MAP1B. Si bien MAP1B no estabiliza microtúbulos de manera tan eficiente como las proteínas Tau o MAP1A (Takemura y col., 1992), no se puede descartar que la desestabilización de microtúbulos afecte en parte la morfología presináptica observada. Por ejemplo en modelos genéticos carentes de kinesinas, donde se altera el transporte a lo largo del axón dependiente de microtúbulos, existe una reducción en el número de vesículas sinápticas presentes en terminales presinápticos y en la densidad de contactos sinápticos (Yonekawa y col., 1998 y Kondo y col., 2012), pudiendo entonces suponer que en parte el fenotipo observado en neuronas MAP1B *-/-* probablemente radica no solo en la disminución de la conformación dimérica de Snapin, sino que también puede existir una componente relacionada con la desestabilización de microtúbulos.

Fenotipo presináptico aberrante en neuronas MAP1B *-/-* se podría explicar por una deficiencia en el tráfico retrógrado axonal

Snapin se ha caracterizado como una proteína presente en terminales presinápticos que favorece la neurosecreción a través de su interacción con proteínas del complejo SNARE (Ilardi y col., 1999, Chheda y col., 2011, Pan y col., 2009). Sin embargo, en los últimos años se ha descrito a Snapin como un interactor de componentes que regulan el tráfico retrógrado axonal, específicamente con la cadena intermedia de la dineína (*Dynein Intermediate Chain, DIC*), y que esta interacción regula el tráfico retrógrado de endosomas tardíos desde la periferia axonal hacia el soma (Cai y cols, 2010 y Ye y Cai, 2014). Similarmente Snapin participa en el tráfico retrógrado de endosomas de señalización positivos para el receptor de BDNF, TrkB (Shou y col., 2012). La pérdida de función de Snapin en neuronas MAP1B *-/-* puede provocar

una deficiencia en el transporte retrógrado en estas neuronas. Existe el antecedente que MAP1B regula el tráfico retrógrado de mitocondrias a través del axón, y que en ausencia de MAP1B, la proteína asociada a microtúbulos LIS1 (*Lisencephaly-related protein 1*) aumenta su interacción con dineína (Jiménez-Mateos y cols, 2005 y Jimenez-Mateos y col., 2006). Tanto la pérdida de función de MAP1B como la de Snapin afectaría el tráfico retrógrado axonal, sin embargo tampoco se puede descartar que estas dos proteínas formen parte de un complejo multimérico con componentes del complejo motor dineína que regulen positivamente el transporte retrógrado de componentes sinápticos. Cualquiera sea el caso, una alteración en el tráfico retrogrado podría dar cuenta del fenotipo aberrante observado de terminales presinápticos en neuronas MAP1B *-/-*, puesto que la correcta localización de los componentes moleculares de terminales presinápticos requiere la operación coordinada del transporte axonal anterógrado y retrógrado (Krueger y col., 2003 y Ou y col., 2010). Un tráfico retrogrado anormal tendría entre otros efectos la acumulación aberrante de componentes presinápticos a lo largo del axón (Kuoshika y col., 2004 y Fejtova y col., 2009), impidiendo la correcta conformación tanto de componente estructurales como funcionales en terminales nerviosos.

Comparación entre protocolos de reconstrucción de estructuras sinápticas

Se generaron dos protocolos utilizando los programas Imaris e ImageJ. En el primero, se reconstruyen estructuras tridimensionales (3D), y en el segundo las imágenes adquiridas en *z-stack* son proyectadas sobre un plano donde se realizan los análisis (2D), basándose en un protocolo previamente descrito en la literatura (Christopherson y col., 2005 e Ippolito y Eroglu 2010). Todos los parámetros analizados y comparados entre neuronas WT y MAP1B *-/-*

presentan las mismas variaciones independiente del protocolo utilizado, dando robustez a la descripción realizada del fenotipo presináptico. Con respecto a la determinación del número de contactos sinápticos, se ha descrito que análisis de colocalización de señales fluorescentes en 2D genera una sobreestimación en el número de eventos de colocalización, debido a la superposición aparente de señales que se encuentran en planos focales distintos (Schätzle y col., 2011). Sin embargo, el protocolo de reconstrucción en 2D es más estricto al momento de establecer colocalización de señales, ya que no se establece previamente un rango de proximidad para definir que dos puntos se encuentran colocalizando, como en el caso de las reconstrucciones en 3D. Es por esto que la proporción de señales presinápticas y postsinápticas que colocalizan obtenida con el método de detección en 2D basado en ImageJ, entrega un porcentaje de colocalización inferior al obtenido con el análisis 3D basado en Imaris. Cabe destacar que cualquiera sea el caso, la distancia abarcada por el eje z al momento de realizar *z-stacks* de regiones dendríticas es en promedio 4-5 μm , un valor pequeño que minimiza la posibilidad de sobreestimar eventos de colocalización (Schätzle y col., 2011). En conclusión, en este trabajo se proponen dos protocolos de reconstrucción que otorgan resultados reproducibles y consistentes entre metodologías, que permiten analizar el número y la estructura de contactos sinápticos generados en neuronas maduras *in vitro*.

Finalmente, cabe destacar que dependiendo de la manera en que se realiza el análisis estadístico, se obtendrán resultados distintos al momento de comparar dos condiciones distintas. Por ejemplo para el caso del análisis de propiedades intrínsecas de puntos presinápticos, existen dos formas de abordar el análisis estadístico. La primera es considerar como número muestral el promedio de los valores obtenidos a partir de cada una de las reconstrucciones, lo que corresponde al número final de reconstrucciones generadas. La

segunda, es considerar el total de puntos generados, lo que entrega un número muestral sumamente alto, correspondiente al total de puntos analizados independiente del número de reconstrucciones realizadas. El análisis estadístico realizado utilizando la segunda estrategia aumenta la posibilidad de categorizar la diferencia entre dos valores como estadísticamente significativa, debido al gran número de muestras y a la pequeña desviación estándar de la población muestral, a diferencia de la primera estrategia, donde el número muestral es aproximadamente 3 órdenes de magnitud menor, lo que permite que el análisis estadístico sea más estricto al momento de comparar valores.

CONCLUSIONES

Neuronas MAP1B *-/-* presentan un fenotipo presináptico anómalo, caracterizado por una pérdida en la capacidad de establecer y mantener contactos sinápticos *in vitro*, fenómeno que en parte se puede atribuir a la pérdida de función de la proteína Snapin observada en ausencia de MAP1B .

- La proteína MAP1B se expresa en compartimentos axonal y somato-dendrítico en neuronas WT maduras *in vitro*, y también en distintas regiones de cerebro adulto, como bulbo olfatorio, hipocampo, cerebelo y corteza.
- Al comparar neuronas WT y MAP1B *-/-* no existen variaciones en la masa de distintas proteínas pre y postsinápticas evaluadas tanto en etapa embrionaria como en etapa adulta, lo que sugiere que no existe un retraso en la sinaptogénesis en neuronas deficientes para MAP1B.
- Neuronas MAP1B *-/-* presentan un aumento en la proporción de terminales presinápticos huérfanos, indicando una pérdida en la capacidad de generar y mantener contactos sinápticos *in vitro*.

- Existe una disminución en el número de terminales presinápticos positivos para Synaptophysin 1, y postsinápticos positivos para Homer 1 en neuronas MAP1B $-/-$, lo que se traduce en una reducción en la densidad de contactos sinápticos totales.
- Terminales presinápticos de neuronas MAP1B $-/-$ no presentan variaciones en su área al ser comparados con terminales presinápticos de neuronas WT, sin embargo presentan una disminución en la densidad tanto de vesículas sinápticas (SVs) como de vesículas de núcleo denso (DCVs).
- Neuronas MAP1B $-/-$ exhiben un aumento en la proporción de contactos sinápticos inmaduros, lo que se relaciona con una capacidad reducida de establecer contactos sinápticos maduros.
- Neuronas MAP1B $-/-$ presentan una disminución en los niveles de la confirmación dimerica de Snapin, implicando una menor interacción entre componentes del aparato SNARE necesario para la liberación de neurotransmisores, lo que se relacionaría con una neurosecreción alterada.
- La sobreexpresión de Snapin en neuronas MAP1B $-/-$ rescata uno de los fenotipo presinápticos observados, disminuyendo la proporción de terminales presinápticos huérfanos observado en estas neuronas.

BIBLIOGRAFÍA

Altier C, Garcia-Caballero A, Simms B, You H, Chen L, Walcher J, Tedford HW, Hermosilla T, Zamponi GW. The Cav β subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat Neurosci*. 2011 Feb;14(2):173-80.

Andreska T, Aufmkolk S, Sauer M, Blum R. High abundance of BDNF within glutamatergic presynapses of cultured hippocampal neurons. *Front Cell Neurosci*. 2014 Apr 11;8:107.

Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev*. 2004 Apr;84(2):361-84.

Barrientos SA, Martinez NW, Yoo S, Jara JS, Zamorano S, Hetz C, Twiss JL, Alvarez J, Court FA. Axonal degeneration is mediated by the mitochondrial permeability transition pore. *J Neurosci*. 2011 Jan 19;31(3):966-78.

Benoist M, Palenzuela R, Rozas C, Rojas P, Tortosa E, Morales B, González-Billault C, Ávila J, Esteban JA. MAP1B-dependent Rac activation is required for AMPA receptor endocytosis during long-term depression. *EMBO J*. 2013 Aug 14;32(16):2287-99.

Benson DL, Watkins FH, Steward O, Banker G. Characterization of GABAergic neurons in hippocampal cell cultures. *J Neurocytol*. 1994 May;23(5):279-95.

Betke KM, Wells CA, Hamm HE. GPCR mediated regulation of synaptic transmission. *Prog Neurobiol*. 2012 Mar;96(3):304-21.

Bourne J, Morgan JR, Pieribone VA. Actin polymerization regulates clathrin coat maturation during early stages of synaptic vesicle recycling at lamprey synapses. *J Comp Neurol*. 2006 Aug 1;497(4):600-9.

Boyer C, Schikorski T, Stevens CF. Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain. *J Neurosci*. 1998 Jul 15;18(14):5294-300.

Brose N, Rosenmund C, Rettig J. Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Curr Opin Neurobiol*. 2000 Jun;10(3):303-11.

Buxton P, Zhang XM, Walsh B, Sriratana A, Schenberg I, Manickam E, Rowe T. Identification and characterization of Snapin as a ubiquitously expressed SNARE-binding protein that interacts with SNAP23 in non-neuronal cells. *Biochem J*. 2003 Oct 15;375(Pt 2):433-40.

Cai Q, Lu L, Tian JH, Zhu YB, Qiao H, Sheng ZH. Snapin-regulated late endosomal transport is critical for efficient autophagy-lysosomal function in neurons. *Neuron*. 2010 Oct 6;68(1):73-86.

Cajal SR. Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev Trim Histol Norm Patol* 1888 1: 1-10.

Chan KY, Bunt AH. An association between mitochondria and microtubules in synaptosomes and axon terminals of cerebral cortex. *J Neurocytol.* 1978 Apr;7(2):137-43.

Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J. The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci.* 1998 Dec 1;18(23):9733-50.

Chen M, Lucas KG, Akum BF, Balasingam G, Stawicki TM, Provost JM, Riefler GM, Jörnsten RJ, Firestein BL. A novel role for snapin in dendrite patterning: interaction with cypin. *Mol Biol Cell.* 2005 Nov;16(11):5103-14.

Chheda MG, Ashery U, Thakur P, Rettig J, Sheng ZH. Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nat Cell Biol.* 2001 Apr;3(4):331-8.

Chowdhury K, Bonaldo P, Torres M, Stoykova A, Gruss P. Evidence for the stochastic integration of gene trap vectors into the mouse germline. *Nucleic Acids Res.* 1997 Apr 15;25(8):1531-6.

Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell.* 2005 Feb 11;120(3):421-33.

Colicos MA, Collins BE, Sailor MJ, Goda Y. Remodeling of synaptic actin induced by photoconductive stimulation. *Cell.* 2001 Nov 30;107(5):605-16.

Danglot L, Rostaing P, Triller A, Bessis A. Morphologically identified glycinergic synapses in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci.* 2004 Dec;27(4):394-403.

Dalpe G, Leclerc N, Vallée A, Messer A, Mathieu M, De Repentigny Y, Kothary R. Dystonin Is Essential for Maintaining Neuronal Cytoskeleton Organization. *Mol Cell Neurosci.* 1998 Apr;10(5/6):243-57.

Davidkova G, Carroll RC. Characterization of the role of microtubule-associated protein 1B in metabotropic glutamate receptor-mediated endocytosis of AMPA receptors in hippocampus. *J Neurosci.* 2007 Nov 28;27(48):13273-8.

de Wit H, Walter AM, Milosevic I, Gulyás-Kovács A, Riedel D, Sørensen JB, Verhage M. Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell.* 2009 Sep 4;138(5):935-46.

Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 2005;6(1):204.

Del Río JA, González-Billault C, Ureña JM, Jiménez EM, Barallobre MJ, Pascual M, Pujadas L, Simó S, La Torre A, Wandosell F, Avila J, Soriano E. MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. *Curr Biol.* 2004 May 25;14(10):840-50.

Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Lévi S, Isambert MF, Henry JP, Triller A, Gasnier B. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci.* 1999 Mar;112 (Pt 6):811-23.

- Fejtova A, Davydova D, Bischof F, Lazarevic V, Altroch WD, Romorini S, Schöne C, Zuschratter W, Kreutz MR, Garner CC, Ziv NE, Gundelfinger ED. Dynein light chain regulates axonal trafficking and synaptic levels of Bassoon. *J Cell Biol.* 2009 Apr 20;185(2):341-55.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron.* 1998 May;20(5):847-54.
- Fletcher TL, De Camilli P, Banker G. Synaptogenesis in hippocampal cultures: evidence indicating that axons and dendrites become competent to form synapses at different stages of neuronal development. *J Neurosci.* 1994 Nov;14(11 Pt 1):6695-706.
- Fornasiero EF, Raimondi A, Guarnieri FC, Orlando M, Fesce R, Benfenati F, Valtorta F. Synapsins contribute to the dynamic spatial organization of synaptic vesicles in an activity-dependent manner. *J Neurosci.* 2012 Aug 29;32(35):12214-27.
- Friedman HV, Bresler T, Garner CC, Ziv NE. Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron.* 2000 Jul;27(1):57-69.
- Gandini MA, Henríquez DR, Grimaldo L, Sandoval A, Altier C, Zamponi GW, Felix R, González-Billault C. Ca(V)2.2 channel cell surface expression is regulated by the light chain 1 (LC1) of the microtubule-associated protein B (MAP1B) via UBE2L3-mediated ubiquitination and degradation. *Pflugers Arch.* 2014 Feb 26.
- Gardiner J, Overall R, Marc J. The microtubule cytoskeleton acts as a key downstream effector of neurotransmitter signaling. *Synapse.* 2011 Mar;65(3):249-56.
- Garner CC, Kindler S, Gundelfinger ED. Molecular determinants of presynaptic active zones. *Curr Opin Neurobiol.* 2000 Jun;10(3):321-7.
- Garner CC, Zhai RG, Gundelfinger ED, Ziv NE. Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.* 2002 May;25(5):243-51.
- Glynn MW, McAllister AK. Immunocytochemistry and quantification of protein colocalization in cultured neurons. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1287-96.
- Gonzalez-Billault C, Avila J, Cáceres A. Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol Biol Cell.* 2001 Jul;12(7):2087-98.
- González-Billault C, Del Río JA, Ureña JM, Jiménez-Mateos EM, Barallobre MJ, Pascual M, Pujadas L, Simó S, Torre AL, Gavin R, Wandosell F, Soriano E, Avila J. A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration. *Cereb Cortex.* 2005 Aug;15(8):1134-45.
- Gordon-Weeks PR, Burgoyne RD, Gray EG. Presynaptic microtubules: organization and assembly/disassembly. *Neuroscience.* 1982 Mar;7(3):739-49.
- Gray EG. Presynaptic microtubules and their association with synaptic vesicles. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1975 Aug 19;190(1100):367-72.
- Gray EG, Westrum LE, Burgoyne RD, Barron J. Synaptic organisation and neuron microtubule distribution. *Cell Tissue Res.* 1982;226(3):579-88.

- Gundelfinger ED, Fejtova A. Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone. *Curr Opin Neurobiol.* 2012 Jun;22(3):423-30.
- Halpain S, Dehmelt L. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 2006;7(6):224.
- Hamilton AM, Oh WC, Vega-Ramirez H, Stein IS, Hell JW, Patrick GN, Zito K. Activity-dependent growth of new dendritic spines is regulated by the proteasome. *Neuron.* 2012 Jun 21;74(6):1023-30.
- Harris KM, Weinberg RJ. Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 May 1;4(5).
- Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Südhof TC, Niemann H. Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.* 1994 Nov 1;13(21):5051-61.
- Hedstrom KL, Ogawa Y, Rasband MN. AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J Cell Biol.* 2008 Nov 17;183(4):635-40.
- Hirokawa N, Sobue K, Kanda K, Harada A, Yorifuji H. The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1. *J Cell Biol.* 1989 Jan;108(1):111-26.
- Hojjati MR, van Woerden GM, Tyler WJ, Giese KP, Silva AJ, Pozzo-Miller L, Elgersma Y. Kinase activity is not required for alphaCaMKII-dependent presynaptic plasticity at CA3-CA1 synapses. *Nat Neurosci.* 2007 Sep;10(9):1125-7.
- Hotulainen P, Hoogenraad CC. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol.* 2010 May 17;189(4):619-29.
- Hu X, Viesselmann C, Nam S, Merriam E, Dent EW. Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. *J Neurosci.* 2008 Dec 3;28(49):13094-105.
- Hu X, Ballo L, Pietila L, Viesselmann C, Ballweg J, Lombard D, Stevenson M, Merriam E, Dent EW. BDNF-induced increase of PSD-95 in dendritic spines requires dynamic microtubule invasions. *J Neurosci.* 2011 Oct 26;31(43):15597-603.
- Ilardi JM, Mochida S, Sheng ZH. Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission. *Nat Neurosci.* 1999 Feb;2(2):119-24.
- Ippolito DM, Eroglu C. Quantifying synapses: an immunocytochemistry-based assay to quantify synapse number. *J Vis Exp.* 2010 Nov 16;(45).
- Ivenshitz M, Segal M. Neuronal density determines network connectivity and spontaneous activity in cultured hippocampus. *J Neurophysiol.* 2010 Aug;104(2):1052-60.
- Jahn R, Fasshauer D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature.* 2012 Oct 11;490(7419):201-7.
- Jaworski J, Kapitein LC, Gouveia SM, Dortland BR, Wulf PS, Grigoriev I, Camera P, Spangler SA, Di Stefano P, Demmers J, Krugers H, Defilippi P, Akhmanova A, Hoogenraad CC. Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron.* 2009 Jan 15;61(1):85-100.

- Jiménez-Mateos EM, Wandosell F, Reiner O, Avila J, González-Billault C. Binding of microtubule-associated protein 1B to LIS1 affects the interaction between dynein and LIS1. *Biochem J.* 2005 Jul 15;389(Pt 2):333-41.
- Jiménez-Mateos EM, González-Billault C, Dawson HN, Vitek MP, Avila J. Role of MAP1B in axonal retrograde transport of mitochondria. *Biochem J.* 2006 Jul 1;397(1):53-9.
- Kaech S, Banker G. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2406-15.
- Karasawa T, Wang Q, David LL, Steyger PS. CLIMP-63 is a gentamicin-binding protein that is involved in drug-induced cytotoxicity. *Cell Death Dis.* 2010 Nov 18;1:e102
- Kawakami S, Muramoto K, Ichikawa M, Kuroda Y. Localization of microtubule-associated protein (MAP) 1B in the postsynaptic densities of the rat cerebral cortex. *Cell Mol Neurobiol.* 2003 Dec;23(6):887-94.
- Kerppola TK. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1278-86.
- Kitamura C, Shirai K, Inoue M, Tashiro T. Changes in the subcellular distribution of microtubule-associated protein 1B during synaptogenesis of cultured rat cortical neurons. *Cell Mol Neurobiol.* 2007 Feb;27(1):57-73.
- Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K. Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci.* 2006 Sep;9(9):1117-24.
- Ko JK, Ma J. A rapid and efficient PCR-based mutagenesis method applicable to cell physiology study. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005 Jun;288(6):C1273-8.
- Kolodziejwski PJ, Rashid MB, Eissa NT. Intracellular formation of "undisruptable" dimers of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Nov 25;100(24):14263-8. Epub 2003 Nov 12.
- Kondo M, Takei Y, Hirokawa N. Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. *Neuron.* 2012 Feb 23;73(4):743-57.
- Koushika SP, Schaefer AM, Vincent R, Willis JH, Bowerman B, Nonet ML. Mutations in *Caenorhabditis elegans* cytoplasmic dynein components reveal specificity of neuronal retrograde cargo. *J Neurosci.* 2004 Apr 21;24(16):3907-16.
- Krueger SR, Kolar A, Fitzsimonds RM. The presynaptic release apparatus is functional in the absence of dendritic contact and highly mobile within isolated axons. *Neuron.* 2003 Dec 4;40(5):945-57.
- Leenders AG, Lin L, Huang LD, Gerwin C, Lu PH, Sheng ZH. The role of MAP1A light chain 2 in synaptic surface retention of Cav2.2 channels in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2008 Oct 29;28(44):11333-46.
- Lepicard S, Franco B, de Bock F, Parmentier ML. A presynaptic role of microtubule-associated protein 1/Futsch in *Drosophila*: regulation of active zone number and neurotransmitter release. *J Neurosci.* 2014 May 14;34(20):6759-71.

- Lu FM, Hawkins RD. Presynaptic and postsynaptic Ca²⁺ and CamKII contribute to long-term potentiation at synapses between individual CA3 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 14;103(11):4264-9.
- Matus A. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science*. 2000 Oct 27;290(5492):754-8.
- Merriam EB, Lumbard DC, Viesselmann C, Ballweg J, Stevenson M, Pietila L, Hu X, Dent EW. Dynamic microtubules promote synaptic NMDA receptor-dependent spine enlargement. *PLoS One*. 2011;6(11):e27688.
- Miech C, Pauer HU, He X, Schwarz TL. Presynaptic local signaling by a canonical wingless pathway regulates development of the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci*. 2008 Oct 22;28(43):10875-84.
- Miller M, Peters A. Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J Comp Neurol*. 1981 Dec 20;203(4):555-73.
- Morales M, Colicos MA, Goda Y. Actin-dependent regulation of neurotransmitter release at central synapses. *Neuron*. 2000 Sep;27(3):539-50.
- Mozhayeva MG, Sara Y, Liu X, Kavalali ET. Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *J Neurosci*. 2002 Feb 1;22(3):654-65.
- Murthy VN, De Camilli P. Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu Rev Neurosci*. 2003;26:701-28.
- Nakamura Y, Tamura H, Horinouchi K, Shiosaka S. Role of neuropsin in formation and maturation of Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic boutons. *J Cell Sci*. 2006 Apr 1;119(Pt 7):1341-9.
- Navarro A, Encinar JA, López-Méndez B, Aguado-Llera D, Prieto J, Gómez J, Martínez-Cruz LA, Millet O, González-Ros JM, Fernández-Ballester G, Neira JL, Ferrer-Montiel A. Mutation of Ser-50 and Cys-66 in Snapin modulates protein structure and stability. *Biochemistry*. 2012 Apr 24;51(16):3470-84.
- Nothias F, Fischer I, Murray M, Mirman S, Vincent JD. Expression of a phosphorylated isoform of MAP1B is maintained in adult central nervous system areas that retain capacity for structural plasticity. *J Comp Neurol*. 1996 May 6;368(3):317-34.
- O'Connor V, Heuss C, De Bello WM, Dresbach T, Charlton MP, Hunt JH, Pellegrini LL, Hodel A, Burger MM, Betz H, Augustine GJ, Schäfer T. Disruption of syntaxin-mediated protein interactions blocks neurotransmitter secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Oct 28;94(22):12186-91.
- Oliver DL, Shneiderman A. An EM study of the dorsal nucleus of the lateral lemniscus: inhibitory, commissural, synaptic connections between ascending auditory pathways. *J Neurosci*. 1989 Mar;9(3):967-82.
- Ou CY, Poon VY, Maeder CI, Watanabe S, Lehrman EK, Fu AK, Park M, Fu WY, Jorgensen EM, Ip NY, Shen K. Two cyclin-dependent kinase pathways are essential for polarized trafficking of presynaptic components. *Cell*. 2010 May 28;141(5):846-58.
- Pan PY, Tian JH, Sheng ZH. Snapin facilitates the synchronization of synaptic vesicle fusion. *Neuron*. 2009 Feb 12;61(3):412-24.

- Regeer RR, Nicke A, Markovich D. Quaternary structure and apical membrane sorting of the mammalian NaSi-1 sulfate transporter in renal cell lines. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(12):2240-51.
- Reilly JE, Hanson HH, Phillips GR. Persistence of excitatory shaft synapses adjacent to newly emerged dendritic protrusions. *Mol Cell Neurosci.* 2011 Oct;48(2):129-36.
- Rettig J, Neher E. Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science.* 2002 Oct 25;298(5594):781-5.
- Riederer B, Cohen R, Matus A. MAP5: a novel brain microtubule-associated protein under strong developmental regulation. *J Neurocytol.* 1986 Dec;15(6):763-75.
- Riederer BM. Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein. *Brain Res Bull.* 2007 Mar 30;71(6):541-58.
- Rickman C, Davletov B. Mechanism of calcium-independent synaptotagmin binding to target SNAREs. *J Biol Chem.* 2003 Feb 21;278(8):5501-4.
- Rizo J, Chen X, Araç D. Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release. *Trends Cell Biol.* 2006 Jul;16(7):339-50.
- Rizo J, Rosenmund C. Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol.* 2008 Jul;15(7):665-74.
- Sankaranarayanan S, Atluri PP, Ryan TA. Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nat Neurosci.* 2003 Feb;6(2):127-35.
- Scannevin RH, Haganir RL. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci.* 2000 Nov;1(2):133-41.
- Schätzle P, Wuttke R, Ziegler U, Sonderegger P. Automated quantification of synapses by fluorescence microscopy. *J Neurosci Methods.* 2012 Feb 15;204(1):144-9.
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev.* 2000 Apr;80(2):717-66.
- Schoenfeld TA, McKerracher L, Obar R, Vallee RB. MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J Neurosci.* 1989 May;9(5):1712-30.
- Shapira M, Zhai RG, Dresbach T, Bresler T, Torres VI, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC. Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles. *Neuron.* 2003 Apr 24;38(2):237-52.
- Shupliakov O, Bloom O, Gustafsson JS, Kjaerulff O, Low P, Tomilin N, Pieribone VA, Greengard P, Brodin L. Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 29;99(22):14476-81.
- Siksou L, Triller A, Marty S. Ultrastructural organization of presynaptic terminals. *Curr Opin Neurobiol.* 2011 Apr;21(2):261-8.

- Sobotzik JM, Sie JM, Politi C, Del Turco D, Bennett V, Deller T, Schultz C. AnkyrinG is required to maintain axo-dendritic polarity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 13;106(41):17564-9.
- Sorra KE, Mishra A, Kirov SA, Harris KM. Dense core vesicles resemble active-zone transport vesicles and are diminished following synaptogenesis in mature hippocampal slices. *Neuroscience*. 2006 Sep 15;141(4):2097-106.
- Sotelo C. Purkinje cell ontogeny: formation and maintenance of spines. *Prog Brain Res*. 1978;48:149-70.
- Südhof TC. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*. 1995 Jun 22;375(6533):645-53.
- Südhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:509-47.
- Südhof TC. The presynaptic active zone. *Neuron*. 2012 Jul 12;75(1):11-25.
- Südhof TC, Rizo J. Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Dec 1;3(12).
- Takemura R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci*. 1992 Dec;103 (Pt 4):953-64.
- Tian JH, Wu ZX, Unzicker M, Lu L, Cai Q, Li C, Schirra C, Matti U, Stevens D, Deng C, Rettig J, Sheng ZH. The role of Snapin in neurosecretion: snapin knock-out mice exhibit impaired calcium-dependent exocytosis of large dense-core vesicles in chromaffin cells. *J Neurosci*. 2005 Nov 9;25(45):10546-55.
- Torreálba F, Carrasco MA. A review on electron microscopy and neurotransmitter systems. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004 Dec;47(1-3):5-17.
- Tortosa E, Montenegro-Venegas C, Benoist M, Härtel S, González-Billault C, Esteban JA, Avila J. Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *J Biol Chem*. 2011 Nov 25;286(47):40638-48.
- Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakeman P, Doan A, Aakalu VK, Lanahan AA, Sheng M, Worley PF. Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron*. 1999 Jul;23(3):583-92.
- Tucker RP, Garner CC, Matus A. In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron*. 1989 Mar;2(3):1245-56.
- Tyler WJ, Pozzo-Miller LD. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci*. 2001 Jun 15;21(12):4249-58.
- Vaughn JE. Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse*. 1989;3(3):255-85.
- Villarreal-Campos D, Gonzalez-Billault C. The MAP1B case: An old MAP that is new again. *Dev Neurobiol*. 2014 Apr 3.

- Vites O, Rhee JS, Schwarz M, Rosenmund C, Jahn R. Reinvestigation of the role of snapin in neurotransmitter release. *J Biol Chem*. 2004 Jun 18;279(25):26251-6.
- Waites CL, Craig AM, Garner CC. Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci*. 2005;28:251-74.
- Wang HG, Lu FM, Jin I, Udo H, Kandel ER, de Vente J, Walter U, Lohmann SM, Hawkins RD, Antonova I. Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins. *Neuron*. 2005 Feb 3;45(3):389-403.
- Wang JZ, Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol*. 2008 Jun;85(2):148-75.
- Wei S, Xu Y, Shi H, Wong SH, Han W, Talbot K, Hong W, Ong WY. EHD1 is a synaptic protein that modulates exocytosis through binding to snapin. *Mol Cell Neurosci*. 2010 Dec;45(4):418-29.
- Wittenmayer N, Körber C, Liu H, Kremer T, Varoqueaux F, Chapman ER, Brose N, Künner T, Dresbach T. Postsynaptic Neuroligin1 regulates presynaptic maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 11;106(32):13564-9.
- Wong CO, Chen K, Lin YQ, Chao Y, Duraine L, Lu Z, Yoon WH, Sullivan JM, Broadhead GT, Sumner CJ, Lloyd TE, Macleod GT, Bellen HJ, Venkatachalam K. A TRPV Channel in *Drosophila* Motor Neurons Regulates Presynaptic Resting Ca²⁺ Levels, Synapse Growth, and Synaptic Transmission. *Neuron*. 2014 Nov 19;84(4):764-77.
- Yamada T, Yang Y, Huang J, Coppola G, Geschwind DH, Bonni A. Sumoylated MEF2A coordinately eliminates orphan presynaptic sites and promotes maturation of presynaptic boutons. *J Neurosci*. 2013 Mar 13;33(11):4726-40.
- Ye X, Cai Q. Snapin-mediated BACE1 retrograde transport is essential for its degradation in lysosomes and regulation of APP processing in neurons. *Cell Rep*. 2014 Jan 16;6(1):24-31.
- Yonekawa Y, Harada A, Okada Y, Funakoshi T, Kanai Y, Takei Y, Terada S, Noda T, Hirokawa N. Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. *J Cell Biol*. 1998 Apr 20;141(2):431-41.
- Yuste R, Bonhoeffer T. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Jan;5(1):24-34.
- Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC. Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron*. 2001 Jan;29(1):131-43.
- Zhang Q, Li Y, Zhang L, Yang N, Meng J, Zuo P, Zhang Y, Chen J, Wang L, Gao X, Zhu D. E3 ubiquitin ligase RNF13 involves spatial learning and assembly of the SNARE complex. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Jan;70(1):153-65.
- Zhang X, Kim-Miller MJ, Fukuda M, Kowalchuk JA, Martin TF. Ca²⁺-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca²⁺-triggered exocytosis. *Neuron*. 2002 May 16;34(4):599-611.

Zhou B, Cai Q, Xie Y, Sheng ZH. Snapin recruits dynein to BDNF-TrkB signaling endosomes for retrograde axonal transport and is essential for dendrite growth of cortical neurons. *Cell Rep.* 2012 Jul 26;2(1):42-51.

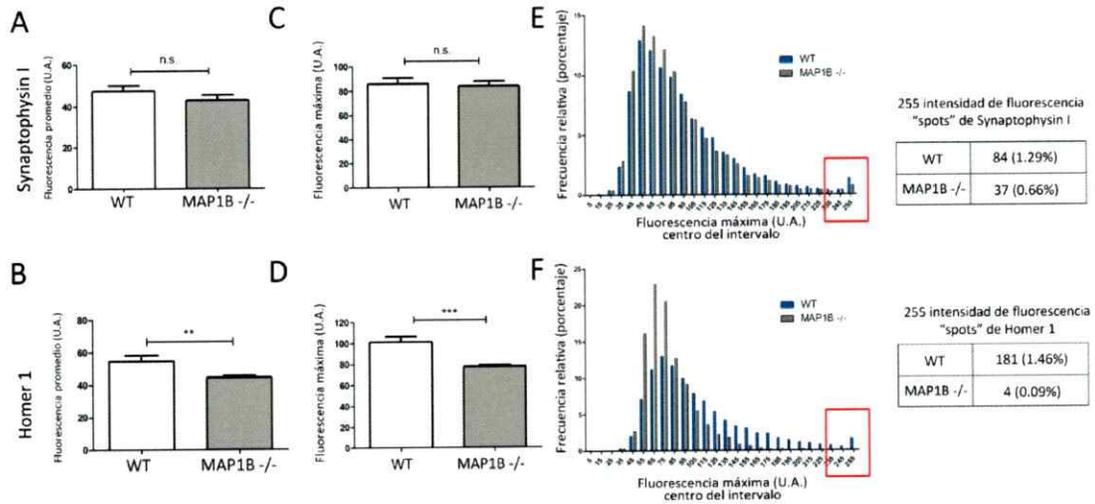
Zhu J, Yan J, Thornhill WB. The Kv1.3 potassium channel is localized to the cis-Golgi and Kv1.6 is localized to the endoplasmic reticulum in rat astrocytes. *FEBS J.* 2014 Aug;281(15):3433-45.

Ziv NE, Garner CC. Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nat Rev Neurosci.* 2004 May;5(5):385-99.

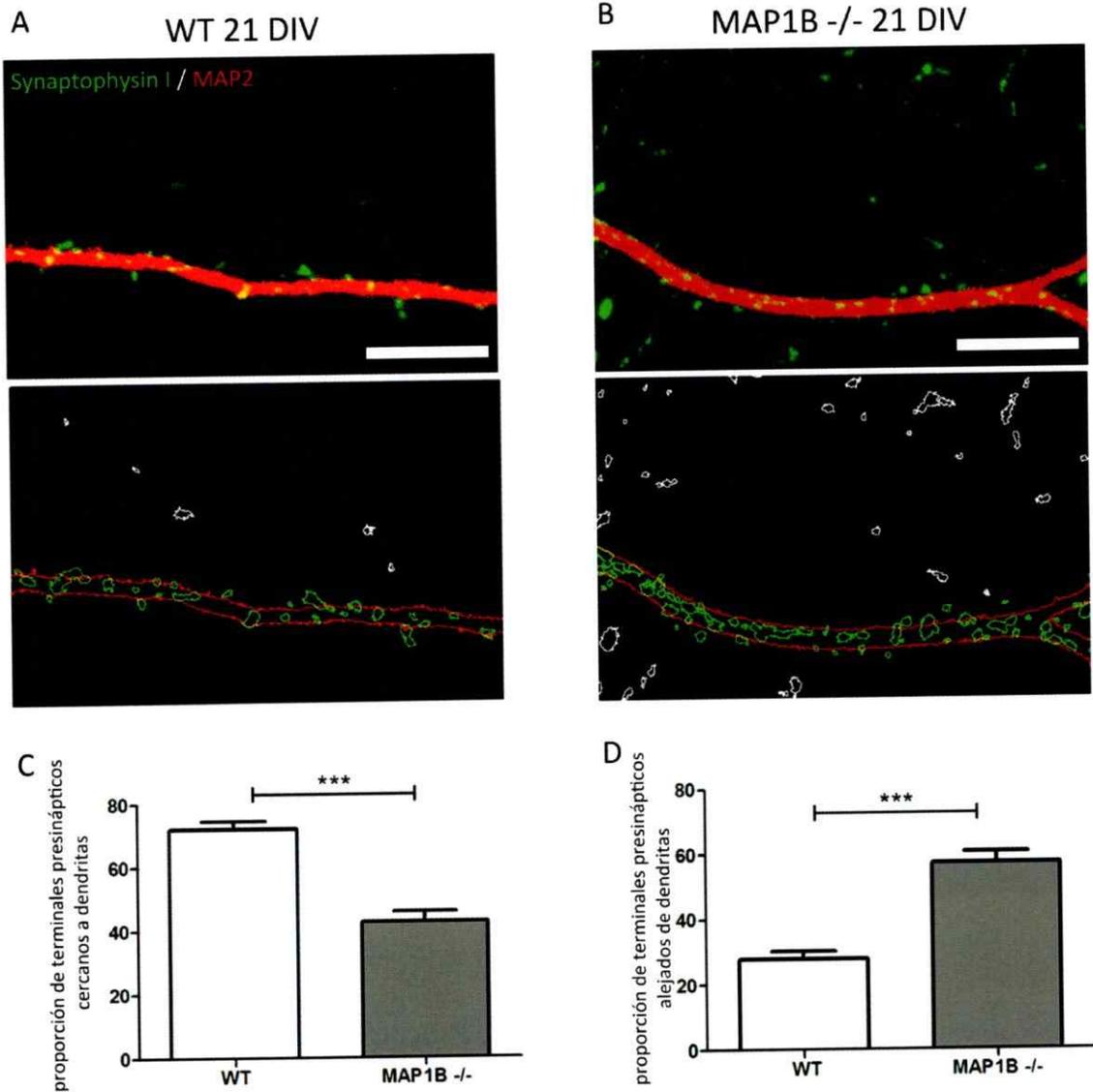
ANEXO

		Área (μm^2)	Fluorescencia promedio (U.A.)	Fluorescencia máxima (U.A.)
Synaptophysin I	WT	1,659 \pm 0,01	49,56 \pm 0,38	93,63 \pm 0,56
	MAP1B -/-	1,593 \pm 0,01	45,15 \pm 0,36	87,22 \pm 0,56
	t-test	***	***	***
Homer 1	WT	0,782 \pm 0,004	58,75 \pm 0,23	106,6 \pm 0,42
	MAP1B -/-	0,642 \pm 0,005	45,29 \pm 0,19	78,70 \pm 0,36
	t-test	***	***	***

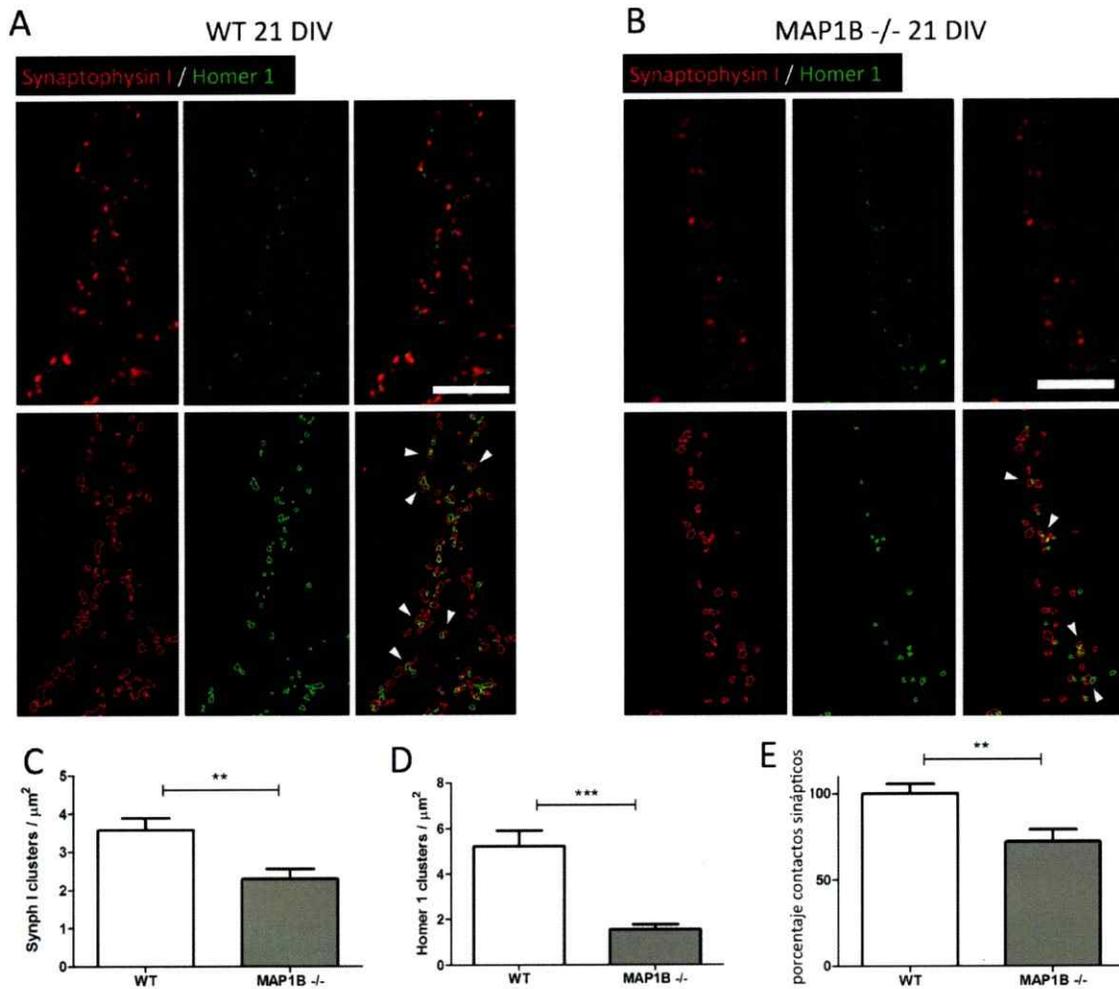
Anexo Tabla 1. Resumen del análisis estadístico llevado a cabo considerando el total de puntos generados con el programa Imaris. Se generaron 6494 puntos presinápticos positivos para Synaptophysin I, y 12331 puntos postsinápticos positivos para Homer 1 en neuronas hipocampales WT 21 DIV. Para neuronas hipocampales MAP1B -/- 21 DIV se generaron 5596 puntos presinápticos y 4526 puntos postsinápticos. Los valores del área, intensidad de fluorescencia promedio y máxima obtenidos al analizar el total de puntos generados, y no el promedio de cada reconstrucción, se resumen en la tabla. Al realizar análisis estadístico sobre el total de puntos, las diferencias son significativas entre genotipos en todos los conjuntos de datos analizados (t-test $p < 0.0001$).



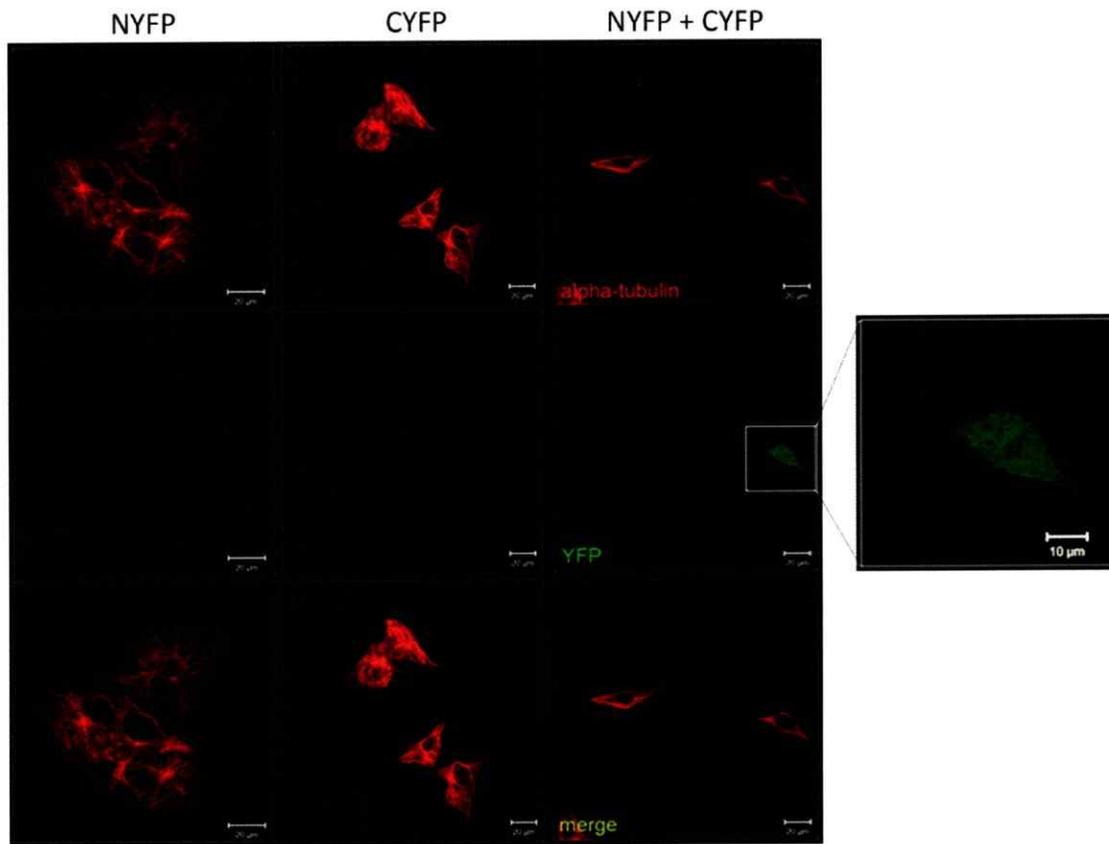
Anexo Figura 1. Comparación entre genotipos de la intensidad de fluorescencia promedio y máxima de puntos pre y postsinápticos generados con Imaris. (A) Intensidad de fluorescencia promedio de puntos Synaptophysin I positivos en neuronas WT 47.43 ± 2.48 u.a., $n=16$; neuronas MAP1B^{-/-} 42.85 ± 2.55 u.a. $n=18$ (t-test, diferencias no significativas). **(B)** Intensidad de fluorescencia promedio de puntos Homer 1 positivos en neuronas WT 54.77 ± 3.49 u.a. $n=16$; neuronas MAP1B^{-/-} 44.64 ± 1.10 u.a. $n=18$ (t-test, $p < 0.05$) **(C)** Intensidad de fluorescencia máxima de puntos Synaptophysin I positivos en neuronas WT 86.09 ± 4.79 u.a. $n=16$; neuronas MAP1B^{-/-} 83.88 ± 3.89 u.a. $n=18$ (t-test, diferencias no significativas). **(D)** Intensidad de fluorescencia máxima de puntos Homer 1 positivos en neuronas WT 101.3 ± 5.33 u.a. $n=16$; neuronas MAP1B^{-/-} 77.50 ± 1.47 u.a. $n=18$ (t-test, $p < 0.0001$). Histograma de frecuencia relativa del valor de intensidad de fluorescencia máxima de puntos Synaptophysin I positivos **(E)** y Homer 1 positivos **(F)** para neuronas de ambos genotipos, donde cada intervalo corresponde a 10 u.a., abarcando desde 0.0 a 260 u.a. Para Synaptophysin I el porcentaje de puntos que alcanza el valor máximo de fluorescencia (255 u.a.) es 1.29% en neuronas WT y 0.66% en neuronas MAP1B^{-/-}. Para Homer 1 el porcentaje de puntos que alcanza el valor máximo de fluorescencia (255 u.a.) es 1.46% en neuronas WT y 0.09% en neuronas MAP1B^{-/-}.



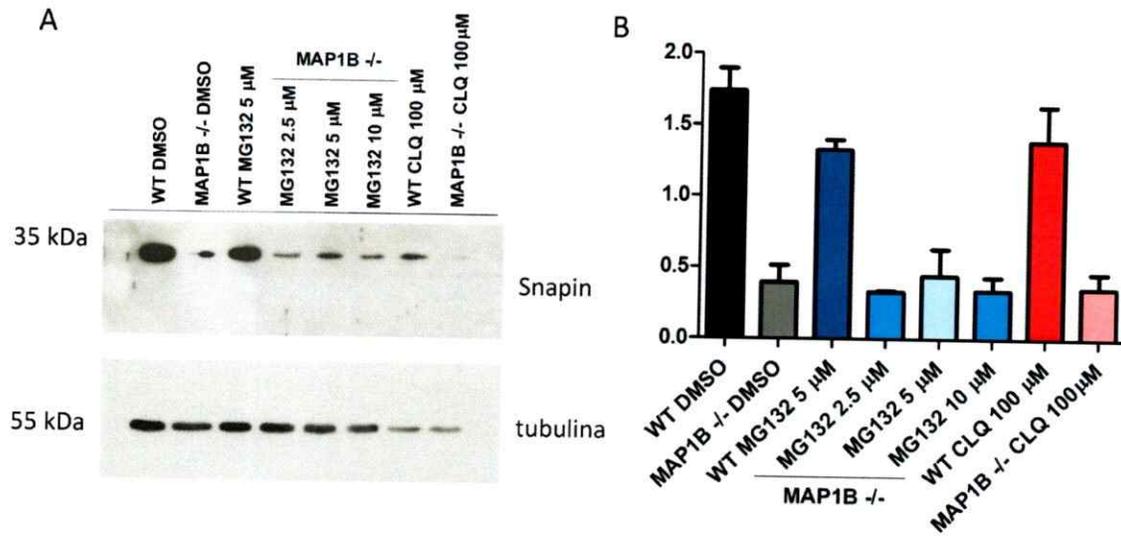
Anexo Figura 2. Análisis con programa ImageJ revela un aumento en la proporción de terminales presinápticos deslocalizados en neuronas MAP1B -/-. En el panel superior se muestran imágenes representativas de inmunocitoquímica sobre neuronas de 21 DIV **(A)** WT y **(B)** MAP1B -/-. Barras de tamaño 5 μ m. Panel inferior muestra las reconstrucciones correspondientes obtenidas utilizando el programa ImageJ (protocolo detallado en sección Materiales y Métodos), donde los contornos rojos representan dendritas MAP2 positivas, los contornos verdes terminales presinápticos cercanos a dendritas, y contornos blancos, terminales presinápticos alejados de dendritas. **(C)** Cuantificación de la proporción de terminales presinápticos cercanos a dendritas en neuronas WT es de 72.19% \pm 2.30% n=15, neuronas MAP1B -/- 42.68% \pm 3.40% n=15. **(D)** Cuantificación de la proporción de terminales presinápticos alejados de dendritas en neuronas WT es de 27.81% \pm 2,30% n=15, neuronas MAP1B -/- 57.32% \pm 3.40% n=15.



Anexo Figura 3. Análisis con programa ImageJ revela que neuronas MAP1B^{-/-} presentan una disminución en el número total de terminales pre y postsinápticos, y en la proporción de contactos sinápticos. En el panel superior se muestran imágenes representativas de inmunocitoquímica sobre neuronas **(A)** WT y **(B)** MAP1B^{-/-}. Barras de tamaño 5 μm . Panel inferior muestra las reconstrucciones correspondientes obtenidas utilizando el programa ImageJ (protocolo detallado en sección Materiales y Métodos), donde los contornos rojos representan terminales presinápticos positivos para Synaptophysin I, y los contornos verdes terminales postsinápticos positivos para Homer 1. Cabezas de flecha blanca muestran sitios de contactos sinápticos. **(C)** Terminales presinápticos positivos para Synaptophysin I por unidad de área en neuronas WT es de 3.58 ± 0.32 terminales presinápticos / μm^2 $n=16$; en neuronas MAP1B^{-/-} 2.30 ± 0.27 terminales presinápticos / μm^2 $n=17$, t-test $p < 0.005$. **(D)** Terminales postsinápticos positivos para Homer 1 por unidad de área en neuronas WT es de 5.23 ± 0.67 terminales postsinápticos / μm^2 $n=16$; en neuronas MAP1B^{-/-} 1.56 ± 0.21 terminales postsinápticos / μm^2 $n=17$, t-test $p < 0.0001$. **(E)** Proporción de contactos sinápticos normalizado contra el valor promedio obtenido para neuronas WT. En neuronas WT la proporción de contactos sinápticos es de $100.0\% \pm 5.45\%$ $n=16$; en neuronas MAP1B^{-/-} $72.13\% \pm 7.04\%$ $n=17$, t-test $p < 0.005$.



Anexo Figura 4. Se observa señal de fluorescencia basal homogénea y ubicua al reconstituir la estructura de la proteína YFP con la expresión de los vectores BiFC vacíos. Células COS7 transfectadas con el vector que codifica para la región amino-terminal de YFP (NYFP), panel de la izquierda, y con el vector que codifica para la región carboxilo-terminal de YFP (CYFP), panel central. Células COS7 co-transfectadas con los vectores NYFP y CYFP, panel de la derecha. La transfección de los vectores vacíos por separado no genera señal de fluorescencia detectable. La co-transfección de ambos vectores vacíos produce señal de fluorescencia tenue que se detecta en forma homogénea en todo el cuerpo celular (*inset*). Marcaje contra α -tubulina se utiliza para delimitar la superficie celular. Barras de tamaño 10 μ m.



Anexo Figura 5. Evaluación de los niveles del dímero de Snapin al inhibir proteosoma y lisosoma. (A) *Immunoblot* representativo de tratamientos farmacológicos por 20 horas, sobre neuronas corticales WT y MAP1B $-/-$ de 13 DIV. Como inhibidor de proteosoma se utiliza el fármaco MG132, y como inhibidor de lisosoma, cloroquina (CLQ). Como vehículo se utiliza dimetilsulfóxido (DMSO). **(B)** Cuantificaciones de los niveles de la proteína Snapin entre los distintos tratamientos para cada genotipo $n=2$ para cada condición.