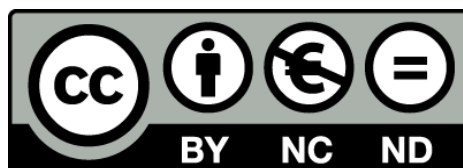


# Papel de la endocitosis mediada por clatrina y de la proteína SPARC sobre la plasticidad sináptica

Francisco José López Murcia



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**

Programa de doctorado en Biomedicina

**PAPEL DE LA ENDOCITOSIS  
MEDIADA POR CLATRINA Y DE LA  
PROTEÍNA SPARC SOBRE LA  
PLASTICIDAD SINÁPTICA**

Tesis Doctoral

**Francisco José López Murcia**

Laboratori de Neurobiologia Cel.lular i Molecular  
Departament de Patologia i Terapèutica Experimental  
Facultad de Medicina, Universitat de Barcelona

Director de Tesis: **Dr. Artur Llobet Berenguer**

Barcelona, 2015



*A mi madre, el SOL de mi ser. Gracias por enseñarme a volar.*

*A Carmen, Reme, Juani y Pedro, mis ángeles de la guarda. Gracias por ayudarme a construir las alas.*

*A mis abuelos, mis mentores. Gracias por enseñarme a descubrir el secreto del viento.*



*"Es preciso sacudir enérgicamente el  
bosque de las neuronas cerebrales  
adormecidas; es menester hacerlas vibrar  
con la emoción de lo nuevo e infundirles  
nobles y elevadas inquietudes"*

Santiago Ramón y Cajal



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

*"El que logra empezar un camino lo tiene ya medio hecho"*

Séneca





<b>ABREVIATURAS</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>19</b>
1. Introducción a la neurotransmisión.	21
2. Fisiología de la sinapsis. Balance exo-endocitosis en el terminal presináptico.	23
2.1. Depósitos de vesículas en el terminal presináptico funcional.	26
2.2. Movilidad de las vesículas en el terminal presináptico funcional.	29
2.3. El debate de la endocitosis como factor limitante de la exocitosis.	32
2.3.1. Heuser & Reese (1973) vs Ceccarelli et al., (1972): el inicio.	32
2.3.2. El debate entre la endocitosis mediada por clatrina vs " <i>kiss-and-run</i> ": la importancia del factor tiempo.	34
2.4. Mecanismos de endocitosis en el terminal presináptico.	37
2.4.1. Endocitosis mediada por clatrina.	37
2.4.2. " <i>Kiss-and-run</i> ".	41
2.4.3. <i>Bulk endocytosis</i> .	43
2.4.4. <i>Ultrafast endocytosis</i> .	44
2.4.5. Maduración de los endosomas en las sinapsis.	45
2.5. Alteración de la fisiología endocítica en el terminal presináptico.	48
2.5.1. Manipulación experimental de la endocitosis mediada por clatrina.	48
2.5.2. La disponibilidad de clatrina en el terminal presináptico.	50
2.5.3. La cooperatividad de clatrina en el terminal presináptico.	51
3. La probabilidad de liberación y el RRP, como primer recurso de la neurotransmisión.	52
3.1. Probabilidad de liberación y su efecto sobre la plasticidad sináptica.	53
4. Refinamiento durante el desarrollo de las sinapsis: maduración y eliminación sináptica.	55
4.1. Aspectos funcionales de la maduración presináptica.	57
4.1.1. El papel del citoesqueleto de actina en la maduración presináptica.	60
4.2. Eliminación sináptica.	62
4.3. Participación de las células gliales en el refinado sináptico.	66
4.4. SPARC y su efecto sobre la neurotransmisión conocido hasta el momento.	70
4.4.1. Naturaleza de la proteína SPARC.	70
4.4.2. Expresión, localización y acción conocida de SPARC.	70
4.4.3. Estructura de SPARC.	71
4.4.4. Indicios del efecto de SPARC sobre la neurotransmisión.	73
<b>OBJETIVOS</b>	<b>75</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>79</b>
1. Cultivos celulares	81
1.1. Cultivos primarios. Microcultivos de neuronas	81
1.1.1. Material	81
1.1.2. Procedimiento	84

1.2. Cultivo de líneas celulares	88
2. Electrofisiología	89
2.1. Experimentos de <i>Voltage-clamp</i>	90
2.1.1. Material	91
2.2. Análisis de los registros de <i>Voltage-clamp</i>	93
2.2.1. Estimación funcional del RRP	94
2.3. Registro de la fluorescencia simultánea a la electrofisiología	96
2.4. Análisis de la fluorescencia simultánea a la electrofisiología	97
3. Inmunofluorescencia correlativa a la electrofisiología	98
3.1. Cuantificación del número de contactos axosomáticos en un microcultivo	99
3.2. Inmunofluorescencia del ganglio cervical superior	100
4. Microscopía electrónica correlativa a la electrofisiología	101
4.1. Material	101
4.2. Procedimiento	103
5. Producción de lentivirus (VIH-1) de alto título mediante transfección de células HEK-293T	107
5.1. Material	108
5.2. Procedimiento	110
6. Infección con lentivirus de microcultivos de neuronas	113
6.1. Procedimiento	114
7. Manipulación de renacuajos de <i>Xenopus tropicalis</i> como modelo <i>in vivo</i>	114
7.1. Material y procedimiento	114
7.2. Procesado de vídeos y análisis cuantitativo	117
8. Inmunofluorescencia de colas de <i>Xenopus tropicalis</i>	117
<b>RESULTADOS</b>	<b>121</b>
1. Caracterización <i>in vitro</i> de los cambios funcionales asociados a la maduración de los terminales presinápticos.	123
1.1. Desarrollo de sinapsis funcionales durante la maduración sináptica	123
1.2. Incremento de la capacitancia de la membrana con la maduración sináptica	124
1.3. Cambios en las corrientes postsinápticas excitatorias evocadas durante la maduración sináptica	125
1.4. Cambios en la plasticidad a corto plazo durante la maduración sináptica	126
1.4.1. Estudio de los cambios en la plasticidad a corto plazo mediante un protocolo de pulsos pareados	126
1.4.2. Implicación del RRP en los cambios de la plasticidad a corto plazo	128
1.5. Modelo de la maduración funcional de las sinapsis colinérgicas <i>in vitro</i>	129
2. Estudio del papel de los niveles sinápticos de clatrina en la neurotransmisión	131
2.1. Cambios plásticos en la neurotransmisión de los SCMs tras períodos de alta actividad	131

2.2. Movimiento de la clatrina presináptica durante períodos de actividad	134
2.3. Efecto de los niveles de clatrina presináptica sobre la neurotransmisión	139
2.4. Relevancia de los niveles de clatrina en la neurotransmisión	155
3. Efectos de la proteína SPARC sobre la maduración sináptica	157
3.1. Efectos de la concentración de SPARC sobre la neurotransmisión	158
3.2. Efectos de SPARC sobre la inmadurez sináptica	162
3.2.1. Efecto de SPARC sobre el citoesqueleto de actina	165
3.3. Identificación del dominio funcional de SPARC. Efecto sobre el fenotipo de inmadurez	169
3.4. Efecto de SPARC como inductor de la eliminación sináptica	172
3.5. Estudio del efecto funcional de SPARC sobre la neurotransmisión <i>in vivo</i>	181
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>189</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>207</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>211</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>229</b>
Anexo I. Preparación del colágeno I a partir de las colas de rata	231
Anexo II. Soluciones	235
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>237</b>
<i>SPARC prevents maturation of cholinergic presynaptic terminals</i>	239
<i>Presynaptic clathrin levels are a limiting factor for synaptic transmission</i>	251
<i>SPARC triggers a cell-autonomous program of synapse elimination</i>	263
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>271</b>



# ABREVIATURAS

*"...en pocas palabras, el lenguaje es a la vez todo el  
hecho de las hablas acumuladas en la historia y  
además el sistema mismo de la lengua"*

Michel Foucault



Se han abreviado preferentemente los términos que contienen más de tres palabras, y se ha conservado la terminología inglesa porque es la forma común en el gueto científico.

**A:** Amperios (derivados: nA, nanoamperio; pA, picoamperios)

**BSA:** Albúmina de suero bovino. Acrónimo del inglés *Bovine Serum Albumin*

**[Ca<sup>+2</sup>]ext:** Concentración extracelular de calcio.

**[Ca<sup>+2</sup>]int:** Concentración intracelular de calcio.

**CCP:** Estructura recubierta de clatrina. Acrónimo del inglés *Clathrin-Coated Pit*

**CCV:** Vesícula recubierta de clatrina. Acrónimo del inglés *Clathrin-Coated Vesicle*

**CFP:** Proteína azul fluorescente. Acrónimo del inglés *Cyan Fluorescent Protein*

**CHC:** Cadena pesada de clatrina. Acrónimo del inglés *Clathrin Heavy Chain*

**CHC-RNAi:** ARN de interferencia para CHC

**CNTF:** Factor neurotrófico ciliar. Acrónimo del inglés *Ciliary Neurotrophic Factor*

**D.I.V.:** días en cultivo. Acrónimo del inglés *Days In Vitro*

**DMEM:** Acrónimo del inglés *Dulbecco's modified Eagle medium*

**DMSO:** Dimetil-sulfóxido

**EC:** Acrónimo del inglés *Extracellular matrix Calcium-binding*

**EGFP:** Proteína verde fluorescente intensificada. Acrónimo del inglés *Enhanced-GFP*

**E.M.:** Microscopía electrónica. Acrónimo del inglés *Electron Microscopy*

**EPSC:** Corriente postsináptica excitatoria. Acrónimo del inglés *Excitatory Postsynaptic Current*

**F-actina:** Actina polimerizada (fibrilar)

**FBS:** Suero bovino fetal. Acrónimo del inglés *Fetal Bovine Serum*

**FL:** Dominio Folistatina

**GL2:** *Homeodomain leucine zipper transcription factor GLABRA2*

**G-actina:** Actina monomérica (glomerular)

**GL2-RNAi:** ARN de interferencia para la proteína GL2

**GM:** Microcultivo con glía. Acrónimo del inglés *Glial microculture*

**GFP:** proteína verde fluorescente. Acrónimo del inglés *Green Fluorescent Protein*

**Hz:** Hercios

**I.F.:** Inmunofluorescencia. Acrónimo del inglés *Immunofluorescence*



**IPSC:** Corriente postsináptica inhibitoria. Acrónimo del inglés *Inhibitory Postsynaptic Current*

**IRM:** Microscopía de interferencia de la reflexión. Acrónimo del inglés *Interference Reflection Microscopy*

**Lat-A:** Latrunculina-A

**LDCV:** Vesículas grandes de núcleo denso. Acrónimo del inglés *Large Dense Core Vesicles*

**K.D.:** Expresión reducida de una proteína. Acrónimo del inglés *Knock-Down*

**min:** Minutos

**mEPSC:** Corriente postsináptica excitatoria en miniatura. Acrónimo del inglés *miniature Excitatory Postsynaptic Current*

**MVB:** Cuerpo multivesicular. Acrónimo del inglés *MultiVesicular Body*

**mRFP:** Proteína roja fluorescente de ratón. Acrónimo del inglés *mouse Red Fluorescent Protein*

**NGF:** Factor de crecimiento nervioso. Acrónimo del inglés *Nerve Growth Factor*

**NGS:** Suero normalizado de cabra. Acrónimo del inglés *Normal Goat Serum*

**nLCa:** Isoforma neuronal de la cadena ligera de clatrina tipo a. Acrónimo del inglés *neuronal Light chain of Clathrin type a.*

**NMJ:** Unión neuromuscular. Acrónimo del inglés *neuromuscular junction*

**PBS:** Tampón fosfato salino. Acrónimo del inglés *Phosphate Buffer Saline*

**P/E:** Penicilina/Estreptomina

**PPD:** Depresión de los pulsos pareados. Acrónimo del inglés *Paired-Pulse Depression*

**PPF:** Facilitación de los pulsos pareados. Acrónimo del inglés *Paired-Pulse Facilitation*

**PPP:** Protocolo de pulsos pareados. Acrónimo del inglés *Paired-Pulse Protocol*

**PPR:** Relación de los pulsos pareados. Acrónimo del inglés *Paired-Pulse Ratio*

**Pr:** Probabilidad de liberación. Acrónimo del inglés *Probability of release*

**RFP:** Proteína roja fluorescente. Acrónimo del inglés *Red Fluorescent Protein*

**RNAi:** ARN de interferencia

**r.p.m.:** revoluciones por minuto

**RP:** Depósito de reciclaje. Acrónimo del inglés *Recycling pool*

**RRP:** Depósito de vesículas de liberación rápida. Acrónimo del inglés *Readily Releasable Pool*

**RS:** Suero de rata. Acrónimo del inglés *Rat Serum*

**s:** Segundos (derivado: ms, milisegundos)

**SCG:** Ganglio Cervical Superior. Acrónimo del inglés *Superior Cervical Ganglion*

**SCM:** Microcultivo de una única célula. Acrónimo del inglés *Single-Cell Microculture*

**SMOC:** Acrónimo del inglés *Secreted Modular Calcium Binding Protein*

**SPARC:** Acrónimo del inglés *Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*

**SpH:** proteína sinaptophluorina

$\tau$ : Constante de tiempo

**TIRF:** Reflexión total de la fluorescencia interna. Acrónimo del inglés *Total Internal Reflection of Fluorescence*

**TN:** Tenascina

**TSP:** Trombospondina

**UV:** Luz ultravioleta

**V:** Voltios (derivado: mV, milivoltios)

**YFP:** Proteína amarilla fluorescente. Acrónimo del inglés *Yellow Fluorescent Protein*



# INTRODUCCIÓN

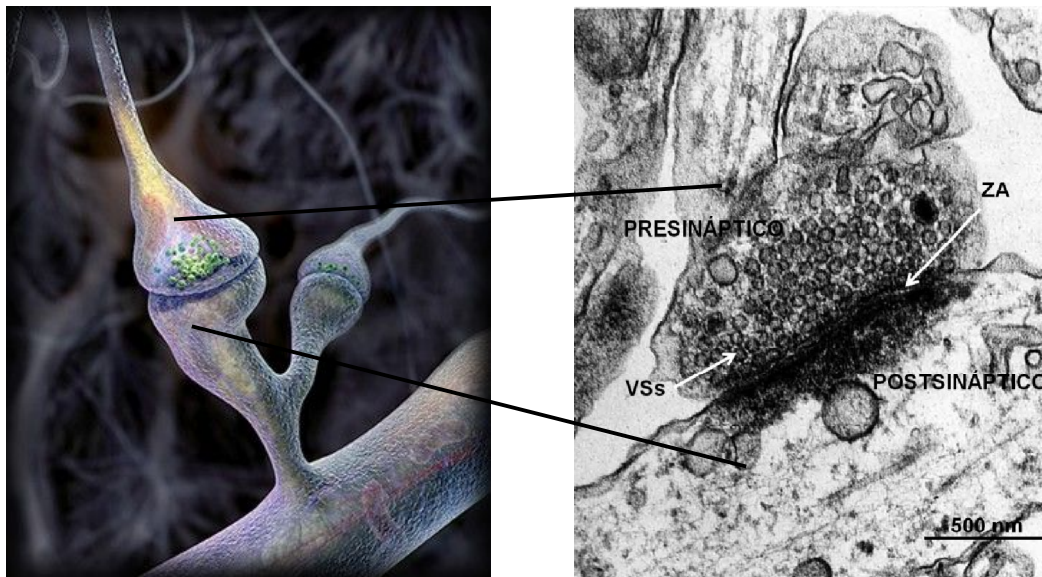
*"No entiendes realmente algo a menos que seas capaz  
de explicárselo a tu abuela"*

Albert Einstein



## 1. INTRODUCCIÓN A LA NEUROTRANSMISIÓN.

A partir de la teoría celular, demostrada en el sistema nervioso por el Dr. Santiago Ramón y Cajal, se ha definido a la neurotransmisión como el mecanismo de comunicación entre dos componentes asimétricos altamente especializados: los terminales pre- y postsinápticos. Ambos constituyen la unidad básica de la comunicación neuronal, la sinapsis química. En sinapsis funcionales, el análisis de la ultraestructura determina que los terminales presinápticos presentan una región electrodensa conocida como zona activa, yuxtapuesta a la densidad postsináptica. Rodeando a la zona activa se delimita un reservorio de vesículas, conocidas como vesículas sinápticas, ordenadas en diferentes depósitos (Fig. I1).

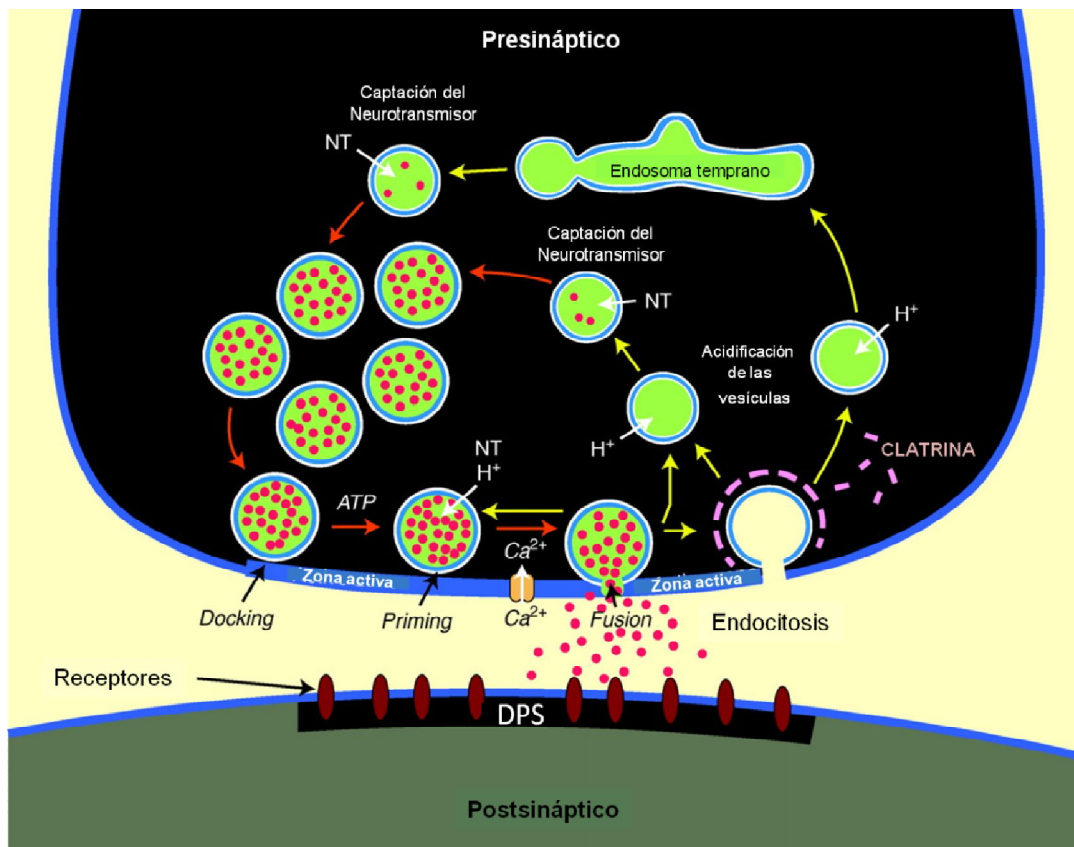


**Figura I1. Ultraestructura de una sinapsis de cerebelo de rata.** El terminal presináptico contiene vesículas sinápticas (VSs), algunas de ellas ancladas a la zona activa (ZA). Imagen modificada de la web de Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie / J. Klingauf.

Las vesículas sinápticas son orgánulos ácidos que contienen neurotransmisor. La neurotransmisión se produce por la llegada de un potencial de acción al terminal presináptico de una neurona, que provoca la entrada de calcio por canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje. El aumento de calcio intracelular causa la exocitosis de las vesículas ancladas a la zona activa, asociada a la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico (Südhof, 1995). El neurotransmisor difunde y se une a los receptores ionotrópicos de la membrana postsináptica (Fig. I2). Como consecuencia se genera un EPSP (*excitatory postsynaptic potential*) en el caso de las sinapsis excitatorias, ó un IPSP (*inhibitory postsynaptic potential*), en el caso de las inhibitorias. Los estudios realizados en la unión neuromuscular (NMJ, *neuromuscular*

*junction*) por Katz y Miledi (Katz & Miledi, 1965), determinaron que, independientemente de la llegada de un potencial de acción, las sinapsis generaban mEPSCs (*miniature excitatory postsynaptic potential*), correspondientes a la liberación de una o pocas vesículas sinápticas. Esta es la base de la teoría cuantal (Del Castillo & Katz, 1954; Heuser & Reese, 1973).

Como consecuencia de la exocitosis, en la NMJ de rana resultó evidente la endocitosis en las regiones periféricas a la zona activa. El reciclaje de la membrana permitía la re-formación de vesículas sinápticas que volvían a formar parte de los reservorios citoplasmáticos (Fig. I2). Los resultados observados otorgaban un papel relevante a la endocitosis en el mantenimiento de los depósitos de vesículas y de la superficie del terminal presináptico.



**Figura I2. Neurotransmisión y ciclo de las vesículas sinápticas en el terminal presináptico.** Con la llegada de un potencial de acción y la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, las vesículas se unen a la zona activa para fusionarse con la superficie y liberar el neurotransmisor al espacio sináptico, que difunde hasta la densidad postsináptica donde se encuentran los receptores específicos. Las membrana vesicular se recicla principalmente por endocitosis mediada por clatrina. La vesícula recién formada se acidifica primero, permitiendo el relleno con neurotransmisor que la hará funcional. Modificada de (Südhof & Rizo, 2011).

Durante la formación del sistema nervioso, los circuitos neuronales se ensamblan formando contactos sinápticos inmaduros. Con el desarrollo, hay un

refinamiento de la conectividad. Al final del desarrollo las sinapsis maduran, presentando una elevada densidad de vesículas en los depósitos citoplasmáticos, y zonas activas capaces de acumular numerosas vesículas. La liberación de las vesículas sinápticas está altamente regulada y depende, entre otros, de una gran variedad de procesos dinámicos conocidos como plasticidad. De los múltiples aspectos de la plasticidad sináptica (capacidad de adaptación a los cambios), hay que resaltar los procesos que afectan al balance exo-endocitosis. Dichos cambios pueden ser de corta o larga duración, y permiten disminuir (depresión) o incrementar (facilitación, potenciación) la potencia sináptica en períodos de actividad (Zucker & Regehr, 2002). Cuando estos procesos plásticos son modificados por la propia neurona como resultado de una actividad previa en el terminal, se conocen como plasticidad homosináptica.

La plasticidad homosináptica es evidente cuando una neurona es sometida a una actividad a alta frecuencia. Depende principalmente de los siguientes factores:

- i)* el balance exo-endocitosis (apartado 2)
- ii)* la probabilidad de liberación a la que opere la sinapsis (apartado 3)
- iii)* el grado de madurez de la sinapsis (apartado 4)

A continuación se presentan los capítulos correspondientes a cada uno de estos factores de la fisiología sináptica.

## **2. FISIOLÓGÍA DE LA SINAPSIS. BALANCE EXO-ENDOCITOSIS EN EL TERMINAL PRESINÁPTICO.**

La neurotransmisión viene sostenida por el balance entre dos mecanismos: la exo- y la endocitosis. Las vesículas que mantienen principalmente este balance son las que se encuentran ancladas a la zona activa, puesto que son las más cercanas a la superficie plasmática, y tienen un mejor acoplamiento con los canales de  $Ca^{+2}$  dependientes de voltaje (Schneggenburger et al., 1999; Hosoi, Holt, & Sakaba, 2009).

Bajo condiciones de actividad baja o moderada, el balance exo-endocitosis del terminal presináptico mantiene el proceso dinámico de fusión y reciclaje permitiendo un relleno continuo del depósito. Las vesículas reformadas acaban trasladándose a la zona activa, evitando un desequilibrio en la plasticidad que conduzca a la depresión sináptica (Fernández-Alfonso & Ryan, 2004). En este caso, la tasa exo-endo  $\sim 1$ .



Pero, dependiendo del circuito neural, cada tipo de sinapsis difiere de otra tanto en el número de vesículas citoplasmáticas como en el tamaño de éstas. Por lo tanto, la actividad límite para mantener el balance exo-endocitosis es necesariamente diferente en distintos tipos de sinapsis (Rizzoli & Betz, 2005). Por ejemplo, las sinapsis de neuronas sensoriales, como las *ribbon synapses* de las células bipolares de la retina o el *Calyx of Held* de las neuronas del tronco del cerebro, disponen de una gran cantidad de vesículas. Existen de ~70000 a ~300000 vesículas, que permiten mantener la neurotransmisión durante períodos sostenidos de actividad. Otras sinapsis como la NMJ, operan a alta probabilidad de liberación, y también contienen un alta densidad de vesículas, ~150000-350000. Sin embargo, la mayoría del sistema nervioso central, operan a baja probabilidad de liberación, presentando terminales más pequeños con apenas ~100–200 vesículas. A continuación, en la siguiente tabla se resume la frecuencia de estimulación umbral que permite mantener la neurotransmisión en diferentes tipos de sinapsis.

Neurona / Tipo de sinapsis	Estimulación para mantener el balance exo-endocitosis	Referencias
<i>Calyx of Held</i>	≤25 Hz	-(von Gersdorff, Schneggenburger, Weis, & Neher, 1997) -(Hermann et al., 2007; Hermann et al., 2009)
Hipocampo	2 -10 Hz	-(Rosenmund & Stevens, 1996) -(Fernández-Alfonso & Ryan, 2004)
NMJ (rana y <i>Drosophila</i> )	≤10 Hz	-(Richards, Guatimosim, Rizzoli, & Betz, 2003)
NMJ (ratón)	≤30 Hz	-(Delgado, Maureira, Oliva, Kidokoro, & Labarca, 2000) -(Kuromi & Kidokoro, 2000)
<i>Ribbon synapses</i> (Neuronas bipolares de la retina )	≤40 Hz	-(Holt, Cooke, Neef, & Lagnado) -(von Gersdorff & Matthews, 1997)

**Tabla I1. Frecuencias de la actividad umbral para el mantenimiento del balance exo-endocitosis en las sinapsis.**

Como se observa, un caso especial son las sinapsis de algunas neuronas sensoriales. Las *ribbon synapses*, encontradas en los fotorreceptores, en las células ciliadas del oído (*hair cells*) y en las neuronas bipolares de la retina (Holt et al.), son capaces de exocitar un elevado porcentaje de vesículas sin provocar un agotamiento de los depósitos antes de que comience la endocitosis. De hecho, resisten

frecuencias fisiológicas de estimulación cercanas a ~40 Hz durante minutos (von Gersdorff & Matthews, 1997). En el *Calyx of Held*, que recibe la información de las *hair cells*, también contiene un gran tamaño y más de 500 zonas activas por terminal (Sätzler et al., 2002). Aunque se desconoce por qué *in vivo* operan a un máximo de 25 Hz liberando sólo 1 vesícula por zona activa, el *Calyx of Held* tiene la capacidad de soportar estimulaciones superiores a 1000 Hz, por sus características morfológicas (Hermann et al., 2007; Hermann et al., 2009).

Sin embargo, en sinapsis convencionales, donde el tamaño de los depósitos es más reducido, el agotamiento es más rápido en períodos de actividad. Por ejemplo, en neuronas de hipocampo el umbral de frecuencia por debajo del cual la tasa endo/exo es ~1, es 10 Hz (Fernández-Alfonso & Ryan, 2004).

Pero, independientemente del número de vesículas, ¿qué factor limita el balance entre la exo- y la endocitosis? Mediante el uso de sinaptopHluorina (VAMP2-pHluorina superreclíptica), se ha determinado que mientras la exocitosis ocurre <1 ms (Südhof, 2013), la constante de tiempo de la endocitosis ( $\tau_{\text{endo}}$ ) es de 4 a 90 s (Sankaranarayanan & Ryan, 2000), siendo el promedio de todos los eventos endocíticos de  $\tau_{\text{endo}} \sim 20$  s (Balaji, Armbruster, & Ryan, 2008). En conclusión, la endocitosis es ~20000 veces más lenta que la exocitosis, y por tanto es la etapa limitante de la neurotransmisión.

De esta forma, la frecuencia de estimulación, influye no sólo en la cantidad de vesículas que se excitan, sino que afecta a toda la homeóstasis de los depósitos de vesículas.

Suponiendo que un terminal tiene 100 vesículas, y cada estímulo aplicado libera una vesícula, cuando es sometido a una estimulación de 1 Hz, se necesitarían 100 s para vaciar todo el terminal. Pero a los ~20 s del comienzo de la estimulación, se reciclaría la primera vesícula que fue excitada, y cada segundo después lo haría el resto de vesículas liberadas. En estas condiciones, la sinapsis es capaz de mantener la neurotransmisión, sin vaciar completamente el depósito de vesículas, evitando la depresión sináptica. Sin embargo, si la misma sinapsis es estimulada a 10 Hz, se necesitarían sólo 10 s para vaciar completamente el terminal presináptico de vesículas, y además la primera vesícula no sería reciclada hasta 10 s después del vaciamiento, para volver a liberarla inmediatamente. En estas condiciones, la neurotransmisión resultaría fuertemente deprimida.

En conclusión, la cinética de endocitosis es clave para la generación de la depresión sináptica durante períodos de alta estimulación.

## **2.1. DEPÓSITOS DE VESÍCULAS EN EL TERMINAL PRESINÁPTICO FUNCIONAL.**

La función de un terminal presináptico varía durante el desarrollo y la actividad. Un terminal maduro o "plenamente funcional", presenta diferentes depósitos de vesículas que pueden ser estudiados bajo diferentes paradigmas de estimulación.

A nivel morfológico, las sinapsis muestran dos tipos de vesículas según su posición: una reducida proporción que tienen una localización privilegiada anclada a la zona activa, ya que serán las primeras en ser liberadas, y la gran mayoría que se encuentran dispersas por el citoplasma (Rizzoli & Betz, 2005). La distribución morfológica está relacionada con la respuesta funcional, que se demuestra bajo una estimulación intensa, produciéndose una liberación secuencial de las vesículas. Por ejemplo, en la NMJ de rana (Delgado et al., 2000) y también en el *Calyx of Held* (Schneppenburger et al., 1999), se observan dos cinéticas de liberación, una más rápida, asociada a las vesículas ancladas a la zona activa, y otra más lenta, asociada al resto.

Ahora bien, del total de vesículas del terminal, más del 50% no se liberan con frecuencias moderadas de actividad. Estos resultados sugieren la presencia de un gran depósito más estático y rígido en el terminal presináptico, que sólo se manifiesta con una cinética de liberación más lenta cuando las sinapsis son sometidas a altas frecuencias de estimulación. La visión actual basada en estudios de colorantes FM y sinaptotfluorina realizados en neuronas de hipocampo, NMJ y el *Calyx of Held* (Fernandez-Alfonso & Ryan, 2008; Opazo et al., 2010; Opazo & Rizzoli, 2010), considera la existencia de tres depósitos funcionales (Denker & Rizzoli, 2010):

- Depósito de vesículas de liberación rápida (RRP, *Readily Releasable Pool*). Se asocia con las vesículas ancladas a la zona activa, siendo las que presentan mayor probabilidad de ser liberadas. Mantienen la neurotransmisión y modifican la plasticidad. En condiciones de actividad moderada el RRP no se libera completamente. Pero bajo intensa estimulación es el primer depósito que se agota favoreciendo la depresión sináptica. Dependiendo del tipo de sinapsis, pueden suponer hasta el 5% de todo el clúster vesicular.

- Depósito de reciclaje (RP, *recycling pool*). Son las vesículas que se liberan en períodos de actividad moderada después del RRP, siendo las responsables en rellenarlo (Richards et al., 2003; Rizzoli & Betz, 2004). Suponen entre 10-25% de todas las vesículas.

- Depósito de reserva. Supone el 75-90% de las vesículas. Presenta una tasa de exocitosis más lenta que el resto porque estas vesículas se encuentran físicamente más alejadas de la zona activa (Kuromi & Kidokoro, 2000). Además se disponen de forma rígida. Por ejemplo, en la NMJ de *Drosophila*, estas vesículas se movilizan para liberarse con una tasa ~7-10 veces más lenta que las del RRP. Para su liberación son necesarios varios segundos a altas frecuencias de estimulación, (p.ej. 40 s a 30 Hz en NMJ, Richards et al., 2003), ó moderadas frecuencias y tiempos prolongados (por ejemplo, ~10 min a 2 Hz en neuronas de hipocampo Ikeda & Bekkers, 2009).

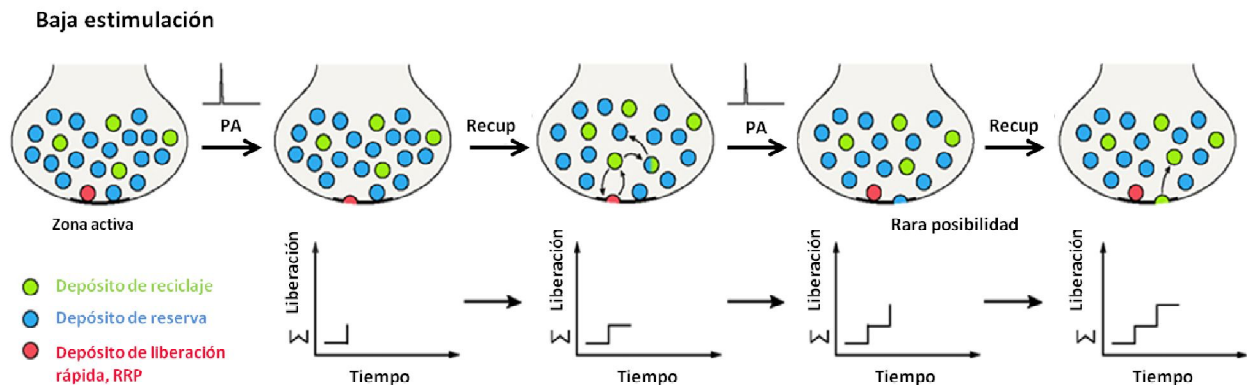
En la siguiente tabla se resumen las características generales asociadas a los depósitos de vesículas clasificados (modificada de (Rizzoli & Betz, 2005):

Depósito	Depósito de liberación rápida, RRP	Depósito de reciclaje, RP	Depósito de reserva
Tamaño % del total de vesículas	~ 1-5 %	~ 10-25 %	~ 75-90 %
Localización de las vesículas	Ancladas a la zona activa	Dispersas en el clúster citoplasmático	Formando el clúster citoplasmático y lejos de la zona activa
Tiempo liberación	<1 s a alta Fr	Pocos segundos a alta Fr	min-h
Reciclaje	Rápido < 10 s	Rápido (s)	Más lento (min)
Mezcla con otros depósitos	Rápida mezcla con el RP	Mezcla con el RRP y lenta mezcla con la reserva	Mezcla lenta con RRP y RP

**Tabla I2. Características de los depósitos de vesículas sinápticas.**

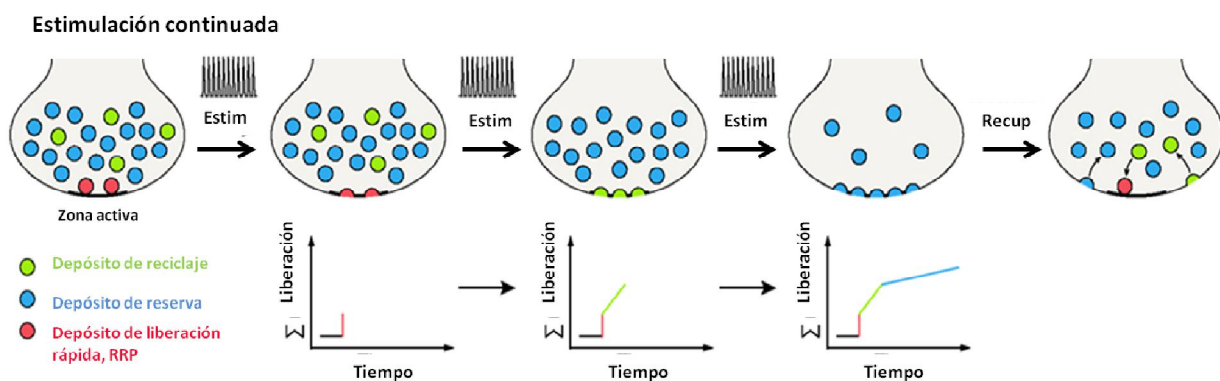
Por lo tanto, los depósitos de las vesículas tienen diferentes tasas de exocitosis en función de la cercanía a la zona activa, afectando a cómo una sinapsis responde a la llegada de potenciales de acción (Denker & Rizzoli, 2010). Cuando las sinapsis se estimulan a una baja frecuencia, el terminal libera parcialmente el RRP, que se recicla posteriormente. El RRP reducido se rellena con vesículas de otros depósitos. Las vesículas generadas por el reciclaje se integran en los depósitos

citoplasmáticos, generando un ciclo. Así, el sistema está preparado para la llegada de otro potencial de acción y la sinapsis no deprime (Fig. I3).



**Figura I3. Cinética de los depósitos presinápticos de vesículas a baja estimulación.** La exocitosis parcial de las vesículas ancladas a la zona activa por la llegada de un potencial de acción, es compensada por el rellenado del RRP con vesículas del resto de los depósitos citoplasmáticos, y por la endocitosis de las vesículas previamente excitadas. Modificado de (Denker & Rizzoli, 2010).

Cuando la sinapsis se somete a una actividad continuada, el RRP es el primer depósito en ser excitado completamente, y después se liberan las vesículas relativamente móviles, como las del RP. Posteriormente, si la actividad continúa, se liberan las vesículas citoplasmáticas más retenidas, las del depósito de reserva. Los depósitos quedan agotados alcanzando la depresión sináptica. Se recuperan con el final de la actividad, al cabo de decenas de segundos/minutos (Fig. I4).



**Figura I4. Cinética de los depósitos presinápticos de vesículas frente a una estimulación continuada.** El RRP es el primero en liberarse. Posteriormente se liberan las vesículas sinápticas menos retenidas, como las del RP que están dispersas por el citoplasma. Posteriormente, si la actividad continúa, se liberan las vesículas más retenidas, las del depósito de reserva. Los depósitos quedan agotados alcanzando la depresión sináptica que se recuperan con el final de la actividad. Modificado de (Denker & Rizzoli, 2010).

En resumen, las vesículas sinápticas pueden presentar diferente disposición en el citoplasma, afectando a su disponibilidad para la exocitosis. La localización de las vesículas en el terminal (o pertenencia a un depósito determinado) viene

influenciada por, entre otros, dónde se endocitan, y por la movilidad de las vesículas recién formadas (Saheki & De Camilli, 2012).

## **2.2. MOVILIDAD DE LAS VESÍCULAS EN EL TERMINAL PRESINÁPTICO FUNCIONAL.**

Los primeros modelos realizados mediante técnicas microscópicas poco resolutivas dotaban de una baja movilidad a las vesículas del terminal presináptico (Rosahl et al., 1995; Pieribone et al., 1995). Se sugerían que estaban rígidamente dispuestas en los tres depósitos con cinéticas bien definidas: RRP y depósito de reserva con coeficientes de difusión casi nulos, y RP, con una movilidad relativa (Lemke & Klingauf, 2005).

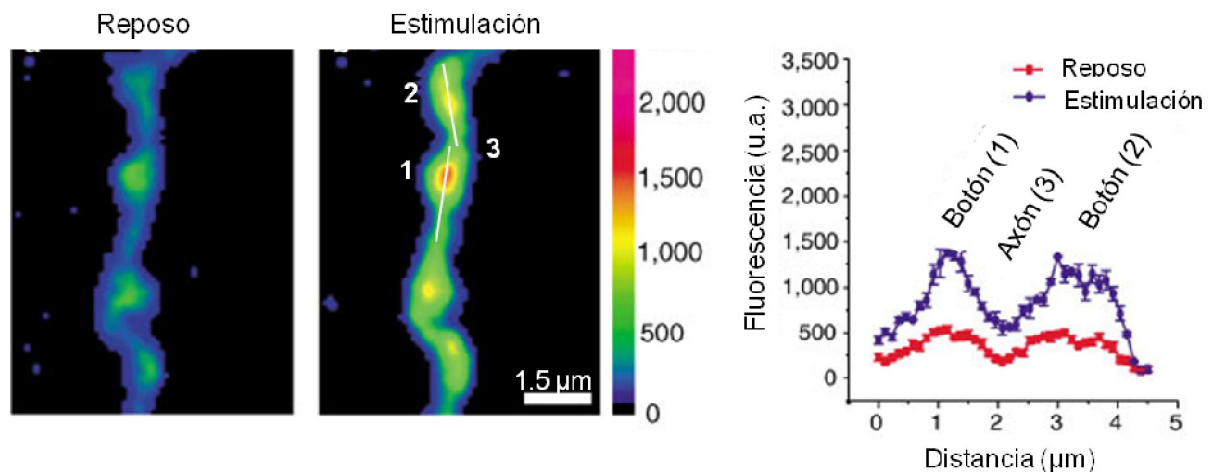
El desarrollo de las técnicas de microscopía óptica de alta resolución ha permitido revisar esta visión. Por ejemplo, se han afianzado observaciones antiguas en terminales fotoconvertidos de la NMJ de rana, que mostraban una distribución aleatoria de las vesículas recién endocitadas por todo el terminal presináptico (Ceccarelli et al., 1972). Estudios recientes en la NMJ (Rizzoli & Betz, 2004; Gaffield, Rizzoli, & Betz, 2006) y en neuronas de hipocampo (Kamin et al., 2010), proponen un modelo en el que las vesículas liberadas del RRP que se endocitan, difunden de forma azarosa por el terminal presináptico, constituyendo el depósito de reciclaje. Pero en algunos momentos estas vesículas sinápticas pueden quedar retenidas, "maduran", adquiriendo una cinética nula, y formando el depósito de reserva. Este fenómeno es reversible, y el RRP puede ser rellenado tanto por vesículas procedentes de los depósitos de reciclaje como de reserva (Kamin et al., 2010).

Por lo tanto, las vesículas son dinámicas y no estáticas, favoreciendo un intercambio entre los depósitos en función de las necesidades. La movilidad dependerá del número de vesículas que tengan los terminales y del tipo de sinapsis. En el caso de las *ribbon synapses*, estudios de FRAP y TIRF han demostrado que todas las vesículas presentan una elevada movilidad, con un alto coeficiente de difusión,  $\sim 1.5 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ , en zonas de confinamiento muy reducidas donde se encuentran los *ribbons* y las zonas activas. Debido al elevado número de vesículas en los terminales, se generarían  $\sim 30000$  colisiones/s. Así, se justifica que la exocitosis en esta sinapsis pueda ocurrir con una tasa de 500-1000 vesículas/s y el rellenado del RRP ocurra como un fenómeno de alta probabilidad (Holt et al., 2004). Por contra, en las sinapsis de neuronas de hipocampo, que contienen unos

depósitos más pequeños y 1-2 zonas activas/terminal, las vesículas son mucho más estáticas. Estas características disminuyen las probabilidades de colisión y de desplazamiento hasta la zona activa, y así la tasa de exocitosis durante una actividad sostenida (Kamin et al., 2010).

La movilidad no es sólo importante a nivel intra-sináptico, sino también a nivel inter-sináptico. Se ha demostrado que existen vesículas que salen del terminal presináptico hacia otros terminales vecinos. Así, se ha sugerido que existe un "súper-depósito", cuyas vesículas pertenecen a varios terminales a la vez, manteniendo el equilibrio homeostático también entre diferentes sinapsis (Darcy, et al., 2006; Kamin et al., 2010; Staras et al., 2010).

Estos argumentos hacen que el lugar donde se produce la endocitosis sea clave para la organización de los depósitos y la localización ulterior de las vesículas.

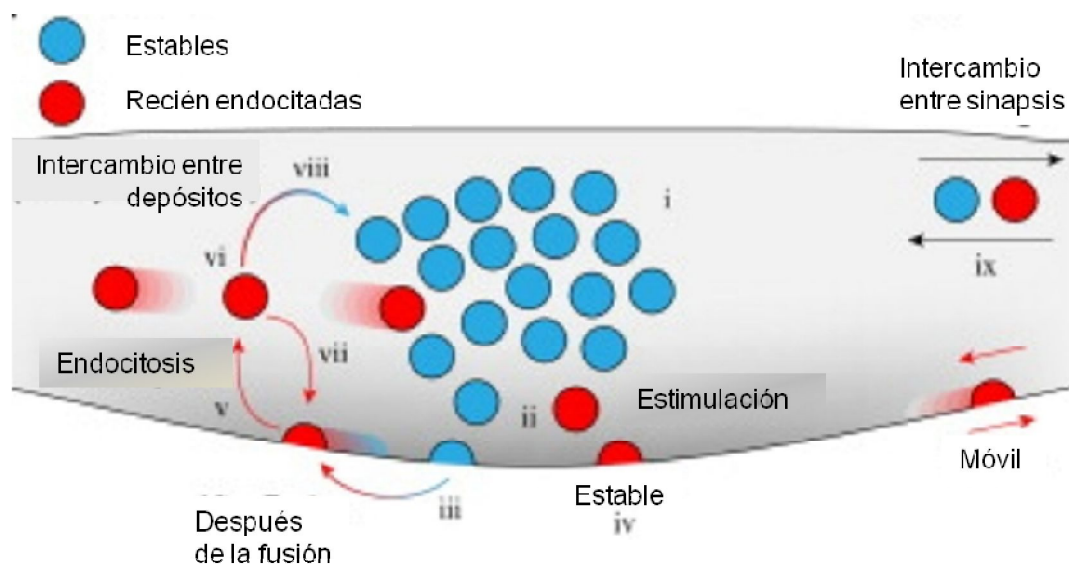


**Figura 15. Las proteínas de las vesículas difunden lateralmente por la superficie tras la exocitosis.** Axón de una neurona de hipocampo que expresa sinaptotagmina (verde). Imágenes de pseudofluorescencia antes y durante 600 estímulos a 20 Hz. El gráfico indica el incremento de la fluorescencia durante la estimulación tanto en los terminales presinápticos como en las regiones intermedias del axón. Modificado de (Sankaranarayanan & Ryan, 2000).

Después de la exocitosis, las proteínas de la membrana vesicular difunden por la superficie plasmática tras la exocitosis (Sankaranarayanan & Ryan, 2000). Estas proteínas se conocen como "carga", y son reconocidos por las proteínas de la maquinaria endocítica para reciclarlos. El desplazamiento lateral de los "carga" depende de numerosos factores, pero principalmente de la cantidad de vesículas fusionadas, y la mayor o menor difusión implicaría el desplazamiento de las proteínas endocíticas a regiones alejadas de la zona activa, influyendo en la  $\tau_{\text{endo}}$  (Saheki & De Camilli, 2012). Por ejemplo, en neuronas de hipocampo que expresan sinaptotagmina, la intensa estimulación provoca un incremento de fluorescencia

tanto en los botones sinápticos como en las regiones del axón entre los botones sinápticos (Fig. I5).

Algunos trabajos observan, en ocasiones, una baja tasa de movilidad de los "carga" desde la fusión de las vesículas hasta la endocitosis 15-20 s después, sugiriendo que las proteínas se disponen en forma de clúster o agregados y que por tanto no pierden su integridad (Fig. I6, Kamin et al., 2010). Además, se ha encontrado que, con el final de la estimulación, no existe una compensación total entre toda la membrana excitada y la reciclada, quedando una porción remanente de "carga" en la superficie plasmática. Este fenómeno tiene relación con otros estudios que indican que existe un depósito de vesículas preparadas para ser recicladas (*Readily Retrievable Pool*) en la superficie plasmática, en condiciones de reposo, que se endocitan paralelamente a la exocitosis cuando se vuelve a iniciar la actividad (Wienisch & Klingauf, 2006; Hua et al., 2011; Balaji & Ryan, 2007).



**Figura I6. Los depósitos de vesículas sinápticas son dinámicos.** Las vesículas en reposo (i, azul) son más estables que durante la actividad (ii, rojo). Con la fusión, algunas vesículas difunden lateralmente (iii), y otras permanecen retenidas en la superficie (iv). La endocitosis (v) genera un depósito de vesículas de reciclaje que es dinámico (vi). Estas vesículas pueden quedar estáticas (viii) de forma reversible, o incluso rellenar el RRP (vii). También, las vesículas pueden intercambiarse con otras sinapsis (ix). Modificado de (Kamin et al., 2010).

Se han obtenido evidencias recientes que, en reposo, los "carga" de las vesículas remanentes en la superficie, permanecen recubiertos de clatrina, sugiriendo que esta proteína podría ser la responsable de evitar su libre difusión por la superficie, reteniendo la integridad de las vesículas (Kamin et al., 2010). Si estos depósitos están secuestrados ya como estructuras recubiertas de clatrina, cuyo reclutamiento y estructuración es la etapa limitante de la formación de una vesícula



por este mecanismo, podrían justificarse los eventos endocíticos con  $\tau_{\text{endo}} < 5$  s observados en algunos trabajos (Pyle, et al., 2000; Balaji & Ryan, 2007; Gandhi & Stevens, 2003).

Por lo tanto, el reciclaje de la membrana mediado exclusivamente por clatrina podría dar respuesta a los eventos con  $\tau_{\text{endo}}$  tan dispares, y ser el principal mecanismo de endocitosis en el terminal presináptico, con una cinética rápida ( $\tau \leq 5$  s) y una lenta ( $\tau \sim 20$  s), respectivamente.

Aún así, la endocitosis mediada por clatrina continúa siendo limitante en el ciclo de las vesículas. Hay que tener en cuenta que las neuronas de hipocampo pueden trabajar varios segundos a 40 Hz. Y, paradójicamente la neurotransmisión se mantiene. En este sentido se formulan las siguientes cuestiones: ¿es la endocitosis mediada por clatrina el único mecanismo de reciclaje, aunque ha sido observada en todos los tipos de sinapsis?, si no es así ¿qué otros mecanismos existen y qué cinética tienen? Esta controversia ha reclamado la atención de los neurocientíficos durante más de 40 años, y los mecanismos precisos por lo que se recicla la membrana excitada y se reforman las vesículas sinápticas, continúan siendo un enigma.

## **2.3. EL DEBATE DE LA ENDOCITOSIS COMO FACTOR LIMITANTE DE LA EXOCITOSIS.**

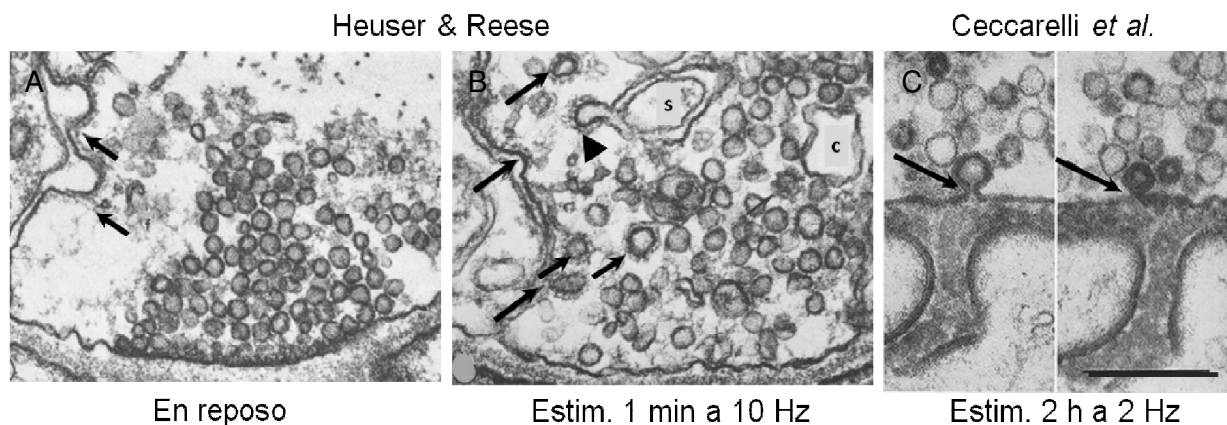
### **2.3.1. Heuser & Reese (1973) vs Ceccarelli *et al.* (1972): el inicio.**

Una de las primeras sugerencias de la existencia de un mecanismo de endocitosis compensatoria en la membrana de los terminales presinápticos, fue expuesta por Bittner y Kennedy en 1970 en la NMJ del cangrejo de río, cuya superficie crecía con la estimulación y se recuperaba con el final de la actividad (Bittner & Kennedy, 1970). A partir de observaciones como ésta, la endocitosis ha sido ampliamente investigada en todos los modelos neuronales.

En estudios morfológicos de la NMJ de rana, sometida a estimulación en presencia de la peroxidasa del rábano picante y fotoconvertida, Heuser and Reese (1973) evidenciaron la reducción del número de vesículas sinápticas de los terminales con la actividad. Paralelamente, observaron la aparición de diversas estructuras endocíticas cargadas con peroxidasa (Fig. 17A-B): cisternas membranosas, vesículas recubiertas de clatrina (CCVs, *clathrin-coated vesicles*), e

incipientes estructuras recubiertas de clatrina a partir de la superficie (CCPs, *clathrin-coated pits*) en regiones alejadas de la zona activa. Cuando los terminales reposaban después de la estimulación, antes de ser fijados, presentaban de nuevo vesículas sinápticas funcionales, aunque cargadas con la peroxidasa, sugiriendo que la re-formación de las vesículas podría ocurrir por el mecanismo de endocitosis mediada por clatrina (CME, *clathrin-mediated endocytosis*) directamente desde la superficie plasmática, ó a través de intermedios membranosos en forma de cisternas (Heuser & Reese, 1973; Miller & Heuser, 1984).

En la misma preparación, pero con un paradigma de estimulación más suave, Ceccarelli *et al.* observaron, además de CCPs y CCVs, intermedios de membrana en forma  $\Omega$  directamente en la zona activa y sin la cubierta de clatrina. Puesto que los intermedios tenían unas dimensiones similares a las vesículas sinápticas, se sugirió que, además de CME, las vesículas podían fusionarse parcialmente y reciclarse a través de un estrecho poro reversible, sin perder totalmente su identidad (Fig. 17C). Este hipotético mecanismo de fusión transitoria fue reforzado incluso por la evidencia de la falta de depresión en el número de vesículas de las NMJs estimuladas a baja frecuencia durante un tiempo prolongado (Ceccarelli *et al.*, 1972). Más tarde, a este mecanismo se le concedió el término de "*kiss-and-run*" (Fesce *et al.*, 1994).



**Figura 17. Endocitosis mediada por clatrina vs "*kiss-and-run*" en la unión neuromuscular de rana.** Ultraestructura bajo diferentes paradigmas de estimulación en presencia de la peroxidasa. A) Terminal no estimulado. Aumento x110. B) Terminal estimulado 1 min a 10 Hz. Obsérvense cuerpos membranosos de los cuales se forman CCPs (cabeza de flecha) y CCPs directamente en superficie plasmática (flechas). Aumento x110. C) Terminal fotoconvertido estimulado a 2 Hz durante 2 h. Obsérvense una fusión transitoria de la vesícula con la membrana. Barra de calibración 250 nm. A y B modificada de (Heuser & Reese, 1973); C modificada de (Ceccarelli *et al.*, 1972).

A partir de estas observaciones, se establecieron dos modelos de acoplamiento exocitosis-endocitosis que resultaron antagónicos: la fusión completa de las

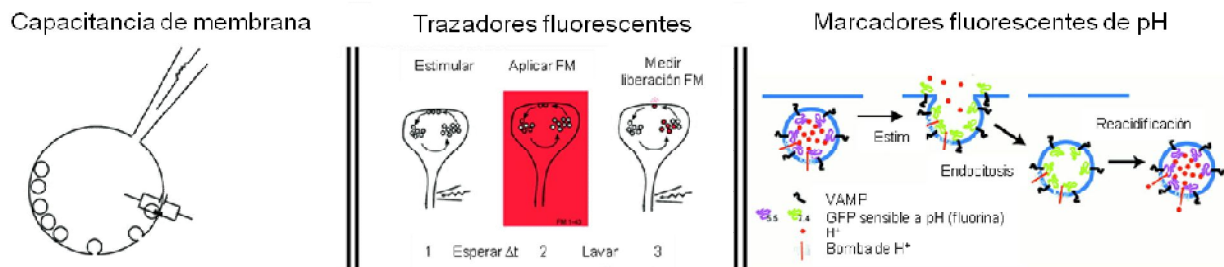
vesículas con la superficie durante la exocitosis, asociado a la endocitosis mediada por clatrina como mecanismo de reciclaje, o alternativamente, la formación transitoria de un poro entre la vesícula y la superficie plasmática. A partir de aquí surgió el debate fusión completa *vs* "*kiss-and-run*".

### **2.3.2. El debate entre la endocitosis mediada por clatrina *vs* "*kiss-and-run*": la importancia del factor tiempo**

Como se ha expuesto, el proceso de reciclaje está condicionado por el factor tiempo. Aparentemente, la fusión completa de las vesículas sinápticas con la superficie y la endocitosis mediada por clatrina, sugieren un mecanismo demasiado lento cuando las sinapsis requieren de vesículas funcionales para seguir manteniendo el flujo de información.

Estudios durante la década de los 90, evidenciaron que en general las sinapsis presentaban dos mecanismos de endocitosis con  $\tau_{\text{endo}}$  diferentes: una lenta  $<1$  s, y una rápida  $>10$  s. Por analogía con los estudios morfológicos, se asoció el mecanismo rápido con "*kiss-and-run*" (Fig. 19) y el lento con CME (Fig. 19), sugiriéndose incluso que el primero era el que ocurría en condiciones de actividad moderada. En este contexto, "*kiss-and-run*" parecía solucionar el problema del tiempo a nivel funcional. La controversia reside en que, desde Ceccarelli *et al.* (1973), han habido muy pocas evidencias de poros de fusión (Park *et al.*, 2012), mientras que la fusión completa y el reciclaje CME siempre han sido observados.

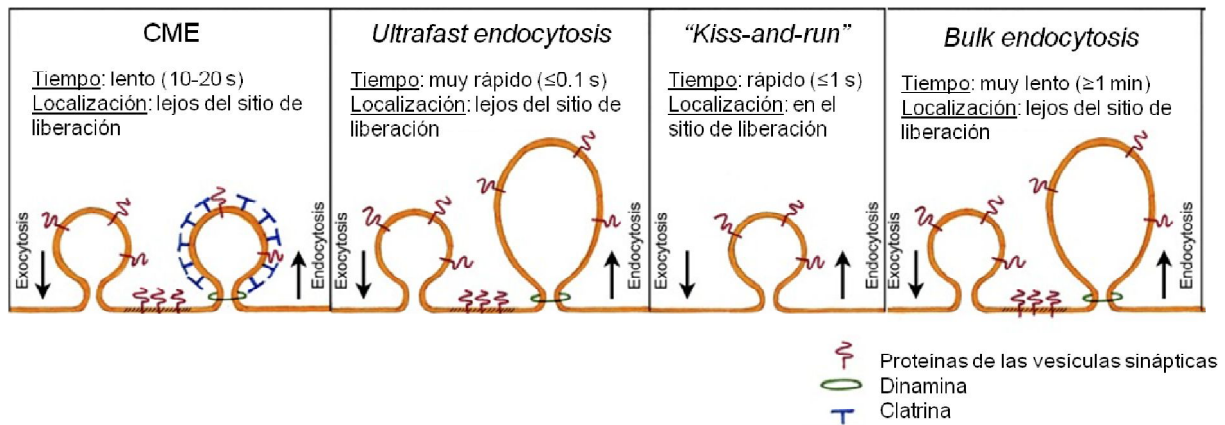
Así, para intentar solventar este debate, se ha utilizado un arsenal de técnicas electrofisiológicas y ópticas de forma correlativa, a parte de la microscopía electrónica, para la visualización en tiempo real del reciclaje de las vesículas (Fig. 18). Principalmente, se han utilizado: los registros de capacitancia, para determinar los cambios en la superficie de la membrana durante la fusión/reciclaje de las vesículas (Gillespie, 1979; Neher & Marty, 1982; von Gersdorff & Matthews, 1994; Sun *et al.*, 2002); el uso de trazadores fluorescentes, como los colorantes de estirilo FM, que se unen de forma reversible a la membrana bilipídica de las vesículas formadas durante la endo- y son liberados durante la exo- (Cochilla, Angleson, & Betz, 1999; L. G. Wu & Betz, 1996); y el uso de indicadores fluorescentes sensibles a pH, como pHluorina, un derivado de GFP (Miesenböck *et al.*, 1998), expresado constitutivamente en la parte luminal de proteínas de las vesículas, que permite visualizar el reciclaje de una única proteína vesicular.



**Figura 18. Técnicas biofísicas para el estudio de la exo-endocitosis en neuronas.** (Izq) Estimación de los cambios netos de superficie de membrana mediante cambios en la capacitancia. (Centro) Uso de FM. Se basa en tres pasos: aplicación del FM desde el comienzo de la estimulación (1) o un corto período de tiempo después (2). Para evitar señal de fondo se elimina el colorante remanente. Una nueva estimulación permite calcular el FM cargado durante la endocitosis (3). (Dcha). Estudio de los cambios de fluorescencia con los marcadores sensibles a pH fusionados a la parte luminal de una proteína vesicular (VAMP-2, sinaptofisina, vGluT, etc). Modificado de (Ryan & Reuter, 2001)

El conjunto de estas aproximaciones experimentales ha permitido encontrar diferentes cinéticas de endocitosis, de las cuales, morfológicamente se han demostrado CME y la endocitosis mediante la formación de endosomas o "*bulk-endocytosis*" (Cousin, 2009; Richards et al., 2000), pero no "*kiss-and-run*", poniéndolo en cuestión. Por todo esto, se ha aceptado ampliamente que la fusión completa de la membrana vesicular con la superficie plasmática es el mecanismo fisiológico en la sinapsis (Royle & Lagnado, 2010; Shupliakov & Brodin, 2010). Entonces, ¿qué mecanismo explica los eventos endocíticos rápidos encontrados en algunas sinapsis? Por un lado se ha asociado al reciclaje del depósito de vesículas remanentes en la superficie, que ya están recubiertas de clatrina. Con esta explicación, el reciclaje de  $\tau_{\text{endo}} < 1\text{s}$  quedaría incluido como parte del proceso estocástico que es CME (Balaji & Ryan, 2007; J. Dittman & Ryan, 2009).

Sin embargo, estudios recientes en *C.elegans* y en neuronas de hipocampo, mediante estimulación optogenética y congelación inmediata por alta presión, para estudiar la morfología por microscopía electrónica, han revelado otro mecanismo endocítico que ocurre en la escala de ms en una región diferente de la zona activa, partiendo de la fusión completa de las vesículas sinápticas con la superficie plasmática y la formación de cisternas de mayor tamaño que las vesículas sinápticas (Fig. 19), descartando así "*kiss-and-run*". Este mecanismo se conoce como *ultrafast endocytosis* (Watanabe, Liu, et al., 2013). Podría ser una explicación alternativa a los eventos rápidos.



**Figura 19. Modelos de endocitosis de las vesículas sinápticas en el terminal presináptico.** Esquema de los cuatro modelos de endocitosis en la sinapsis donde la endocitosis mediada por clatrina, *ultrafast endocytosis* y *bulk endocytosis* parten de la fusión completa de las vesículas sinápticas y se reciclan en regiones lejanas al sitio de liberación. Modificado de (Kononenko et al., 2013).

Por lo tanto, se han encontrado cuatro posibles mecanismos endocíticos con cinéticas muy diferentes. Pero ¿cuál es el mecanismo principal? ¿cuándo opera uno u otro? Una posible hipótesis es que todos participan en el mismo terminal nervioso, dependiendo de las necesidades y de otros factores como los niveles de calcio, la frecuencia de estimulación, la cantidad de exocitosis o incluso la temperatura. Todas las sinapsis necesitan rellenar sus depósitos de vesículas sinápticas regenerándolas con una forma y tamaño específicos, lo cual supone un proceso complejo que requiere de una distribución de alta fidelidad de las proteínas sinápticas. Y es muy improbable que este proceso ocurra en una escala de ms. Por lo tanto se ha asumido que CME es el principal mecanismo de re-generación de las vesículas sinápticas funcionales en el terminal presináptico (Granseth et al., 2007; Royle & Lagnado, 2010; Shupliakov & Brodin, 2010), sea directamente desde la superficie o a partir de estructuras endosomales. Aún así, deberá ser estudiados el conjunto de mecanismos para entender su posible papel en el terminal presináptico funcional.

Pero en las sinapsis, las membranas no sólo realizan el ciclo funcional de fusión/reciclaje, sino que en ocasiones presentan una dinámica más compleja formándose estructuras intermedias que pueden renovar, equilibrar o eliminar las proteínas y los lípidos de los terminales. Estos procesos también modifican la plasticidad de la sinapsis, y la de todo el sistema (Saheki & De Camilli, 2012).

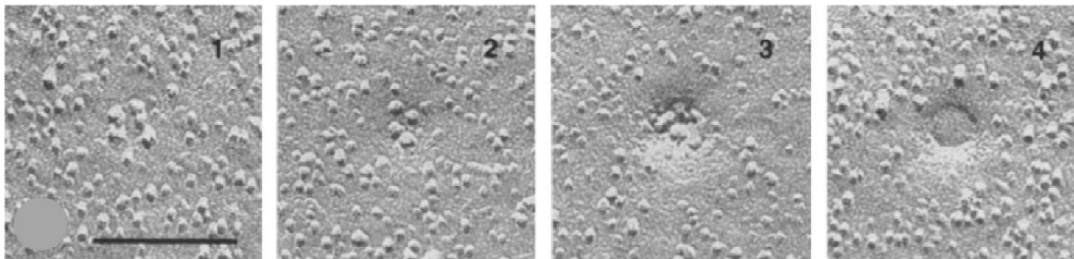
A continuación me centraré en detallar los cuatro mecanismos de endocitosis propuestos, y otras dinámicas de las membranas que participan directamente en los mecanismos de plasticidad a corto plazo, y que en última instancia están

directamente relacionados con el balance exocitosis-endocitosis en el terminal presináptico.

## 2.4. MECANISMOS DE ENDOCITOSIS EN EL TERMINAL PRESINÁPTICO.

### 2.4.1. Endocitosis mediada por clatrina (CME).

Se ha propuesto a CME como el principal mecanismo de endocitosis en el terminal presináptico en condiciones fisiológicas de actividad (Saheki & De Camilli, 2012).



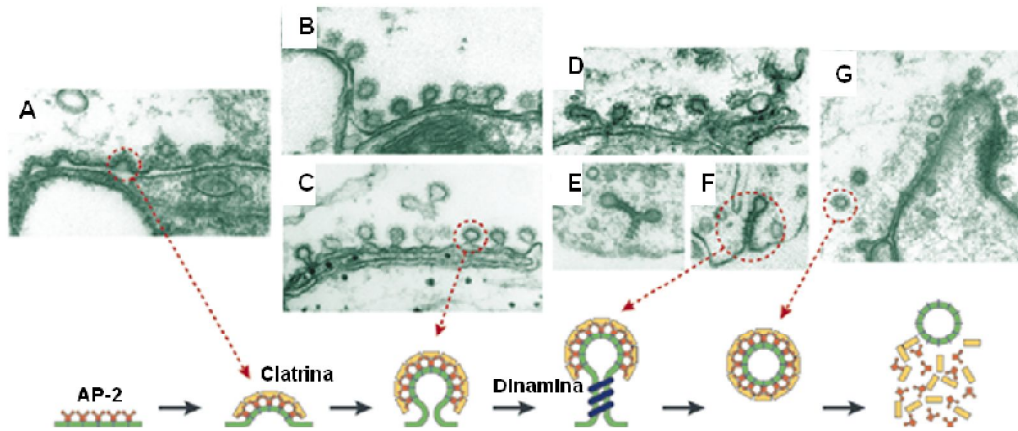
**Figura I10. Secuencia temporal (1-4) del reciclaje de una vesícula tras la liberación del neurotransmisor.** Imágenes tras la criofractura de la membrana plasmática que reflejan la disposición (1-4) de los posibles estadios consecutivos en la formación de una vesícula cubierta (CCP) en la NMJ de rana. Barra de calibración 0.125  $\mu\text{m}$ . Modificado de (Miller & Heuser, 1984)

### Mecanismo

Se asume que ~90% de las estructuras recubiertas con clatrina (CCPs *clathrin-coated pits*) en neuronas formarán vesículas sinápticas (Jung & Haucke, 2007). La CME comprende cuatro etapas (Fig. I11): *i*) ensamblaje y nucleación *ii*) maduración de la estructura cubierta, *iii*) fisión de estructura cubierta de la membrana plasmática y *iv*) desensamblaje de la cubierta para liberar la vesícula.

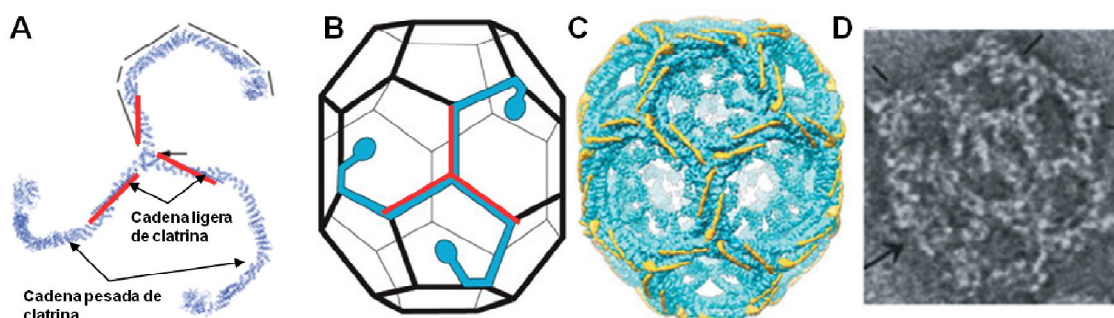
*i*) Ensamblaje y nucleación. Se ha asumido que la primera proteína adaptadora reclutada es AP2 (Cocucci et al., 2012), que contiene diversos dominios de unión a otras proteínas adaptadoras, CLASPs (*clathrin-associated sorting proteins*), y a lípidos como fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, PIP2 (Gaidarov & Keen, 1999; Rohde et al., 2002). Algunas CLASPs conocidas son: AP180/CALM, ARH,  $\beta$ -arrestina, Dab-2, Eps15, epsina, HIP1/HIP1R, numb y estonina2 (McMahon & Boucrot, 2011), y todas, además, tienen motivos de unión a clatrina. Otros estudios han identificado módulos de nucleación diferentes: FCHO, Eps15 e intersectina, previos al reclutamiento de AP2 (Henne et al., 2010; Stimpson et al., 2009). AP2 y CLASPs concentran en la vesícula incipiente a las proteínas que van a ser endocitadas, "carga" (Haucke & De Camilli, 1999), mediante el reconocimiento de sus motivos transmembrana. El

complejo entramado de uniones y reconocimientos amplía el espectro y la capacidad de endocitar clúster proteicos para formar un vesícula con todas las proteínas necesarias para su funcionalidad.



**Figura I11. Estructuras intermedias de CME en diferentes estadios mediante manipulación experimental en la sinapsis reticuloespinal de lamprea.** A) Nucleación de los "carga" y ensamblaje de las proteínas adaptadoras, principalmente AP2. B y C) Reclutaje, formación y maduración de la cubierta de clatrina. D-F) Participación de dinamina en la fisión de la estructura recubierta de clatrina desde la superficie plasmática. G) Desensamblaje de la cubierta de clatrina. Modificado de (Slepnev & De Camilli, 2000).

ii) Maduración del CCP. A continuación, clatrina es reclutada. La clatrina es una proteína soluble en el citoplasma en forma de *triskelion* (Fig. I12), cada uno formado por tres cadenas pesadas (CHC, *clathrin heavy chain*) y tres cadenas ligeras (CLC, *clathrin light chain*), ya que no existen cadenas sueltas solubles. Los *triskelion* polimerizan en torno al sitio de nucleación formando una cubierta con una organización mezcla de pentágonos y hexágonos, en forma de pelota de fútbol.



**Figura I12. Polimerización de los *triskelion* de clatrina.** A) *Triskelion* de clatrina soluble que contiene 3 cadenas ligeras (rojo) y 3 cadenas pesadas (azul). B) Empaquetamiento de los *triskelion* dentro de una cubierta de clatrina. C) Una reconstrucción de una jaula de clatrina con una resolución de 8 Å, donde las cadenas ligeras aparecen en amarillo. D) Imagen de microscopía electrónica de tinción negativa con una resolución de 100 Å. A modificadas de (Xing et al., 2010); B de (Edeling, Smith, & Owen, 2006); C de (Fotin et al., 2004); D de (Kanaseki & Kadota, 1969).

En paralelo ocurre una deformación progresiva de la membrana mediante proteínas accesorias que inducen curvatura. Algunos ejemplos son: epsina (Ford et

al., 2002), con un dominio ENTH (*epsin N-terminal homology*), o anfifisina, endofilina y sindapina (Gallop & McMahon, 2005; Itoh & De Camilli, 2006; Clayton & Cousin, 2009) con un dominio BAR (*Bin, amphiphysin, Rvs*).

*iii*) Escisión (fisión) de la vesícula: El reclutamiento de la enzima dinamina al cuello de la vesícula mediante las proteínas con dominio S-BAR, es requerido para la escisión de la vesícula de la membrana plasmática (Ferguson et al., 2009; Sundborger et al., 2011; Wigge et al., 1997). La fuerza mecánica que escinde la vesícula, se asocia a un cambio conformacional a modo de torniquete, mediante la hidrólisis de GTP (Bashkirov et al., 2008; Chappie, Acharya, Leonard, Schmid, & Dyda, 2010; Faelber et al., 2011; Roux, Uyhazi, Frost, & De Camilli, 2006; Stowell, Marks, Wigge, & McMahon, 1999; Sweitzer & Hinshaw, 1998).

*iv*) Desensamblaje de la cubierta: Tras la fisión, se producen cambios en la composición de los lípidos de la nueva vesícula por la acción de la sinaptojanina, con actividad fosfatasa de lípidos fosfatidil-inositol (Cremona et al., 1999). Este hecho resulta esencial para el reclutamiento de la proteína Hsc70 (Massol, Boll, Griffin, & Kirchhausen, 2006) y su cofactor auxilina (Böcking, Aguet, Harrison, & Kirchhausen, 2011; Xing et al., 2010). Hsc70 desempaqueta la cubierta de clatrina y proteínas adaptadoras mediante la hidrólisis de PIP<sub>2</sub>, para liberarla en el citoplasma.

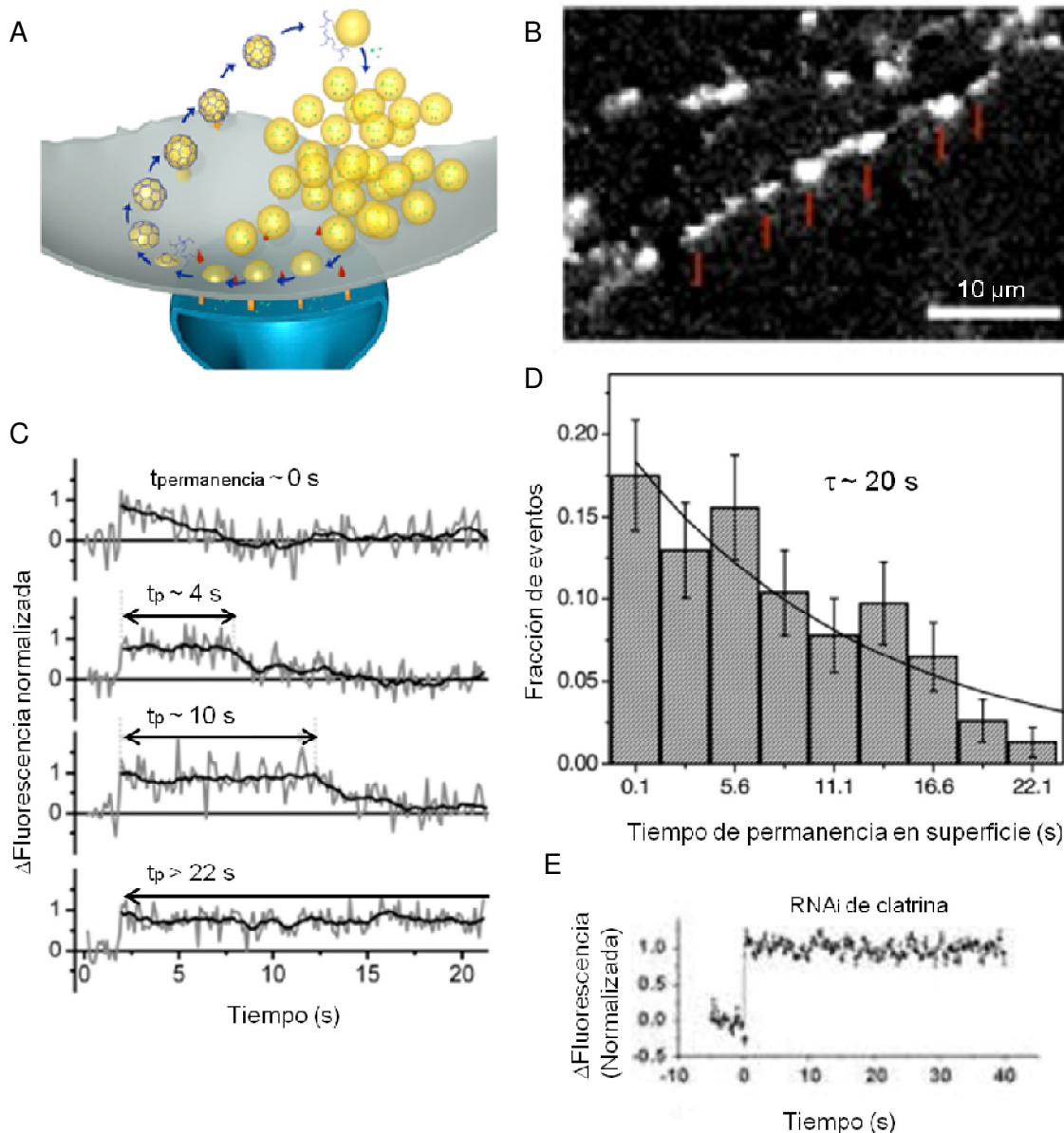
### **Cinética**

La CME es un mecanismo altamente cooperativo, ya que participan numerosas proteínas y todas las etapas están controladas de forma espacio-temporal por el entramado de interacciones proteína-proteína y proteína-lípido (McMahon & Boucrot, 2011).

También es un mecanismo estocástico (Fig. I13), ya que se han observado eventos endocíticos cuyas cinéticas se encuentran en la ventana temporal de 4 a 90 s (Balaji & Ryan, 2007), y todos resultan alterados o inhibidos mediante el uso de un RNA de interferencia (Fig. I13E), tanto para CHC (Granseth et al., 2006; Zhu, Xu, & Heinemann, 2009), como para AP2 (Armbruster & Ryan, 2011). El promedio de todos los eventos tiene una  $\tau \sim 20$  s (Balaji & Ryan, 2007) que consta del proceso de endocitosis desde la superficie (reclutamiento de adaptadores, clatrina, etc) cuya  $\tau_{\text{endo}} \sim 15$  s, y de la acidificación de la vesícula formada en paralelo al rellenado de neurotransmisor,  $\tau_{\text{acidif}} \sim 5$  s (Granseth et al., 2006). Estas constantes cinéticas se



aceleran con la temperatura desde 25°C, a la que están hechos la mayoría de los experimentos, a la temperatura fisiológica 35°C (Granseth & Lagnado, 2008).



**Figura 113. La endocitosis mediada por clatrina es un mecanismo estocástico.** A) Esquema del ciclo de las vesículas endocitadas por CME. B) La expresión de pFluorina se concentra en la sinapsis. Visualización de sinaptophysina en neuronas de hipocampo. C) Ejemplos de cambios de fluorescencia en la superficie plasmática de sinapsis que expresan vGlutpH, indicando diferente permanencia tras la exocitosis. D) La distribución de todos los eventos individuales se ajustan a una función exponencial con  $\tau \sim 20$  s. E) Todos los eventos endocíticos independientemente de su cinética quedan inhibidos con un RNA de interferencia para clatrina. La fluorescencia queda retenida en la superficie plasmática. A modificado de (Kononenko & Haucke, 2015); B de (Granseth et al., 2006) y C-E de (Balaji & Ryan, 2007).

Los trabajos realizados demuestran que no existe un reuso inmediato de las vesículas sinápticas recién endocitadas (Li et al., 2005). La re-formación de vesículas con alta fidelidad para que tengan una composición proteica funcional,

resulta improbable en la escala de ms. Este hecho respalda a CME como principal mecanismo fisiológico. Incluso se ha demostrado que a partir de las cisternas membranosas formadas por "*bulk endocytosis*" y "*ultrafast endocytosis*" se regeneran las vesículas *vía* CME (Cheung & Cousin, 2013; Watanabe et al., 2014).

CME, se observa en todas las sinapsis estudiadas, independientemente del tipo de estimulación. Además, se ha comprobado que cada sinapsis de una misma neurona tiene su propia cinética de endocitosis que afecta a su plasticidad. En conjunto todas las sinapsis dan una  $\tau_{\text{endo}}$  promedio a la neurona, que es diferente a otra neurona (Armbruster & Ryan, 2011).

#### **2.4.2. "Kiss-and-run".**

Este mecanismo de exo-endocitosis defiende una fusión parcial de las vesículas sinápticas con la superficie plasmática, a través de la generación de un poro transitorio que permite la salida del neurotransmisor, para revertir posteriormente y volver a formar parte del depósito de liberación (Fig. I14). Este reciclaje de membrana independiente de clatrina ocurriría en ms y apuesta por un reuso inmediato de las vesículas del RRP. En un principio, este mecanismo rápido de endocitosis se evidenció, sin ningún tipo de duda, en sistemas de liberación neuroendocrina, como en la secreción de serotonina por los mastocitos de ratón (Alvarez de Toledo et al., 1993), o en las células cromafines de la corteza adrenal (Artalejo et al., 1995). Utilizando las mismas técnicas en las células nerviosas, se ha tratado de asociar este mecanismo a los fenómenos de cinética rápida observados en distintos tipos de sinapsis, como en el *Calyx of Held* (Sun et al., 2002), *ribbon synapses* de neuronas bipolares (Llobet et al., 2003), sinapsis de hipocampo (Gandhi & Stevens, 2003) o terminales de la pituitaria anterior (Klyachko & Jackson, 2002), y se ha visto que es muy poco frecuente. A pesar de los numerosos trabajos que han tratado de demostrar "*kiss-and-run*" en sinapsis, son abundantes las contradicciones y la baja reproducibilidad entre estudios experimentales usando protocolos basados en::

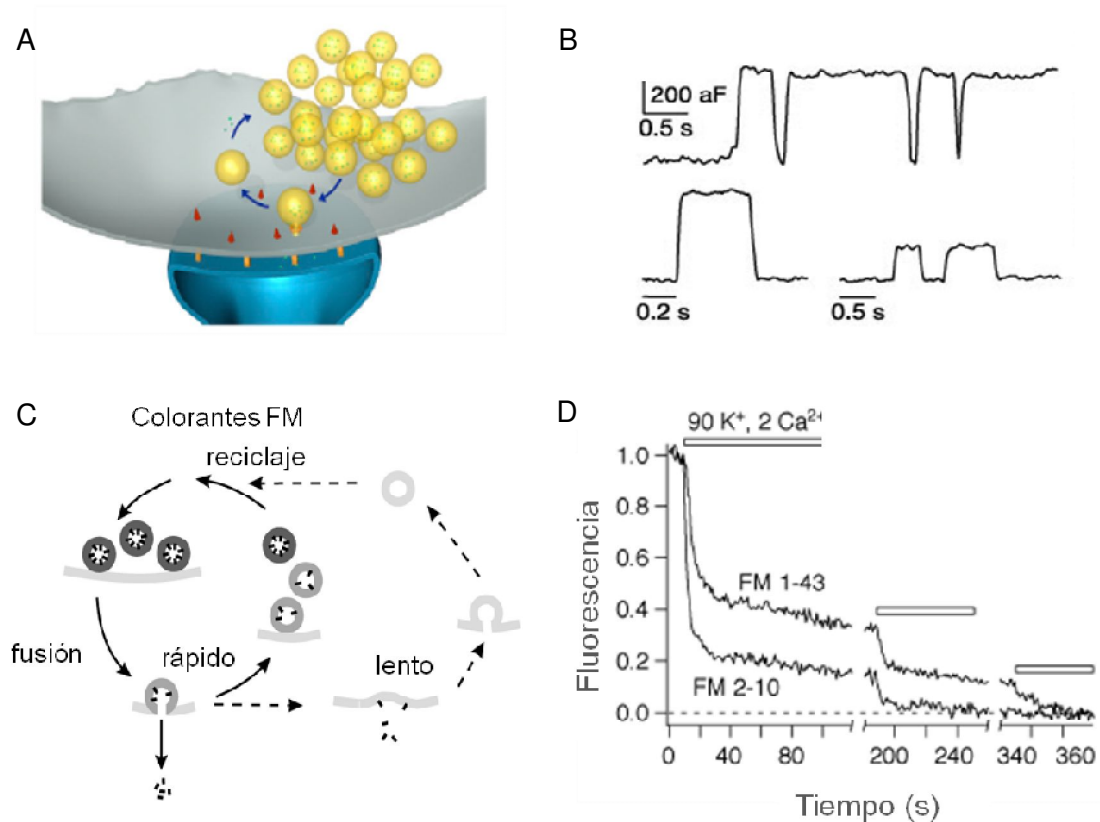
*i)* Aproximaciones de "*imaging*" usando marcadores fluorescentes FM (Fig. I14C-D; Klingauf et al., 1998; Pyle et al., 2000; Stevens & Williams, 2000).

*ii)* La aplicación de diferentes protocolos de estimulación. A pesar de estar asumido que la aplicación de una solución hiperosmótica genera la fusión completa de todo el RRP (Rosenmund & Stevens, 1996), algunos trabajos partidarios del

"kiss-and-run" defienden una caída parcial del colorante FM con este paradigma (Stevens & Williams, 2000), de forma contraria a otros estudios que lo observan con la estimulación eléctrica (Pyle et al., 2000; Sara et al., 2002).

Algunos estudios defienden que "kiss-and-run" es el principal mecanismo a bajas frecuencias de estimulación (<1 Hz) frente a la fusión completa (Sun et al., 2002), y otros al contrario (Aravanis et al., 2003).

iii) Variaciones de los niveles de calcio intra y extracelular (Sun et al., 2002; von Gersdorff & Matthews, 1994; Neves & Lagnado, 1999; Llobet, Wu, & Lagnado, 2008).

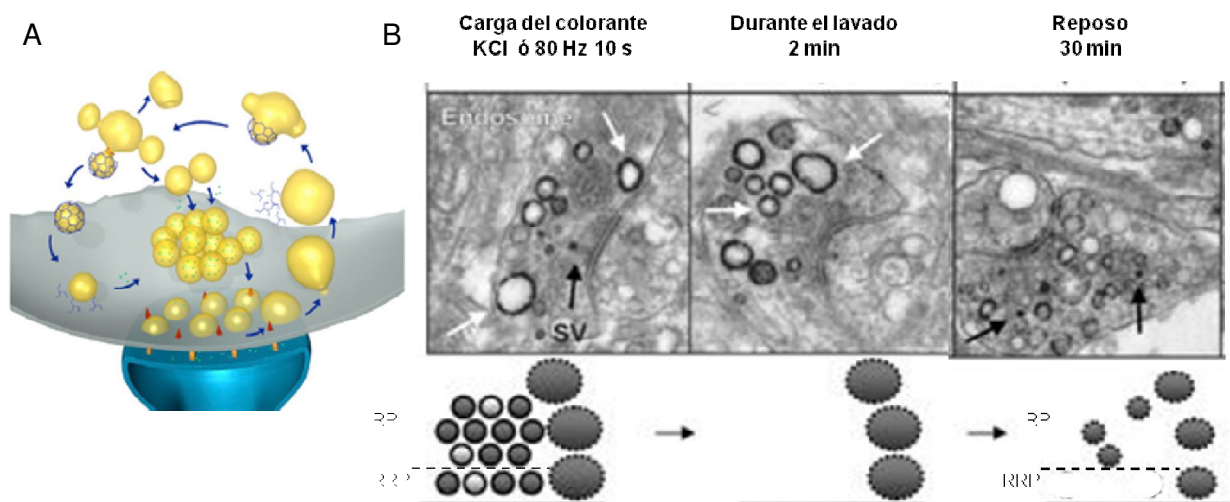


**Figura 114. Mecanismo "kiss-and-run".** A) Esquema del mecanismo "kiss-and-run". B) Eventos capacitativos aislados correspondientes a la fusión de vesículas grandes de núcleo denso, LDCVs, de terminales axónicos de la pituitaria posterior. C) Esquema de la pérdida parcial o total del colorante FM por el mecanismo "kiss-and-run" o de fusión completa, respectivamente. B) Pérdida parcial de dos colorantes FM con distinta afinidad a la membrana lipídica, mediante rondas de perfusión de solución 90 mM de  $K^+$ . Los cambios en la fluorescencia se hacen relativos a la carga total del RRP. A modificado de (Kononenko & Haucke, 2015); B de (Klyachko & Jackson, 2002) y C-D de (Klingauf et al., 1998).

Todas estas contradicciones, han puesto en cuestión a este mecanismo, y se puede considerar un mecanismo poco representativo de los fenómenos de endocitosis que ocurren en la sinapsis (Granseth et al., 2009).

### 2.4.3. Bulk endocytosis

Este mecanismo de cinética muy lenta (decenas de segundos o minutos) consiste en el reciclaje masivo de una gran superficie de membrana plasmática formando cuerpos endosomales. Es independiente de clatrina pero dependiente de dinamina I (Cousin, 2009). Suele ocurrir tras un período de intensa actividad para compensar la saturación de la maquinaria endocítica y la excesiva acumulación de membrana vesicular en la superficie (Royle & Lagnado, 2010). Actualmente se asume que a altas frecuencias de estimulación, CME deja de ser el mecanismo principal en el terminal presináptico y se activa "bulk endocytosis" (Cousin, 2009; Smith et al., 2008). Dicha activación tiene relación con la ralentización de la cinética de endocitosis observada con la excesiva exocitosis (Balaji et al., 2008). Además, al igual que CME, tiene lugar en la zona periaxial, aunque incluso a muy altas frecuencias de estimulación podría producirse en la propia zona activa, como se ha observado en la NMJ de ratón a 100 Hz (Gaffield et al., 2009).



**Figura 115. Endocitosis masiva de la membrana, "bulk-endocytosis".** A) Esquema de *bulk endocytosis*. B) Terminales presinápticos fotoconvertidos, de células granulares de cerebelo, sometidos a alta estimulación (con KCl o 80 Hz 10 s) en presencia de la peroxidasa del rábano picante, y fijados a diferentes tiempos: *i*) durante la estimulación (izq), *ii*) tras 2 min de lavado (centro), o *iii*) tras 30 min de reposo después del lavado (dcha). Obsérvense la formación de endosomas a partir de la superficie (flechas blancas) marcados durante e inmediatamente después de la estimulación. Tras un largo reposo se observan vesículas marcadas, generadas a partir de estos endosomas (flechas negra). A modificado de (Kononenko & Haucke, 2015); B de (Cheung et al., 2010).

El mecanismo ha sido evidenciado en la ultraestructura de diferentes tipos de sinapsis como: en la NMJ (Ceccarelli et al., 1972; Heuser & Reese, 1973; Takei et al., 1996; Richards et al., 2000), en células bipolares de la retina (Holt et al., 2003) y en neuronas centrales (Clayton et al., 2010). Pero, aunque el reciclaje del endosoma

es independiente de clatrina, se ha demostrado que a partir de las cisternas generadas por *bulk endocytosis*, se forman vesículas sinápticas, principalmente vía CME, que pasan a incluirse dentro de los depósitos de reserva y no de reciclaje (Fig. I15). Por lo tanto, la activación de este mecanismo va asociada a la depresión sináptica (Cheung & Cousin, 2013).

La cinética tan lenta de *bulk-endocytosis* hace que se considere un mecanismo poco posible en condiciones fisiológicas de actividad. Sin embargo, esta forma de reciclaje podría ser activada para un fin determinado, como por ejemplo para eliminar masivamente membrana plasmática durante la eliminación sináptica (Bishop et al., 2004).

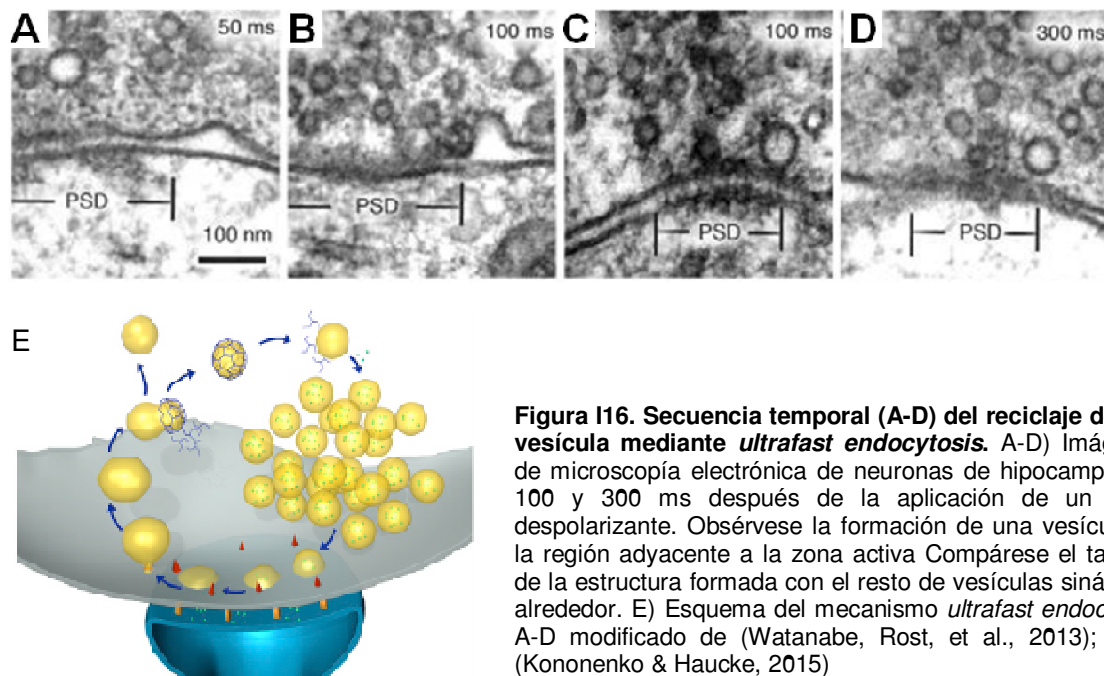
#### **2.4.4. Ultrafast endocytosis.**

Trabajos recientes del Dr. Jorgensen (Universidad de UTAH) y su equipo demuestran, tanto en la NMJ de *C. elegans* como en neuronas hipocampales de ratón, que existe un mecanismo de reciclaje que ocurre entre 50-100 ms después de la exocitosis (Fig. I16), y parte de una fusión completa de las vesículas sinápticas que se exocitan durante la estimulación (Watanabe, Liu, et al., 2013; Watanabe, Rost, et al., 2013; Watanabe et al., 2014).

Para conseguir una resolución temporal tan óptima, las neuronas expresan el canal de rodopsina-2 modificado (*ChIEF*) para despolarizarlas con un pulso de luz azul de 3 ms, y fijarlas 25 ms después por congelación a alta presión. Por microscopía electrónica se observan vesículas sinápticas terminando de exocitar en la superficie justo 25 ms después del pulso. Pero a partir de 50 ms se observan formas  $\Omega$  en regiones distintas de la zona activa, que finalmente se conforman como vesículas de grandes dimensiones tan sólo 100-300 ms después. Las características conocidas de este mecanismo son: es independiente de clatrina, las vesículas formadas tienen un diámetro  $\sim 2.6$  veces el de las vesículas sinápticas; y es dependiente de dinamina y del citoesqueleto de actina (Watanabe, Liu, et al., 2013; Watanabe, Rost, et al., 2013).

Pero ante la duda de la funcionalidad del mecanismo, un reciente estudio demuestra que a partir de los depósitos se forman vesículas sinápticas, en sólo 3 s, mediante un mecanismo dependiente clatrina, ya que el uso de un RNA de interferencia para esta proteína inhibe esta etapa (Watanabe et al., 2014). Por lo tanto, la independencia de clatrina y la participación de dinamina para la formación

de los endosomas, y la subsecuente formación de vesículas sinápticas funcionales vía CME, hacen a *bulk* y *ultrafast endocytosis* mecanismos muy similares aunque con cinéticas muy diferentes, otorgándole un importante papel al mecanismo de clatrina como vía para la re-formación última de las vesículas sinápticas funcionales.



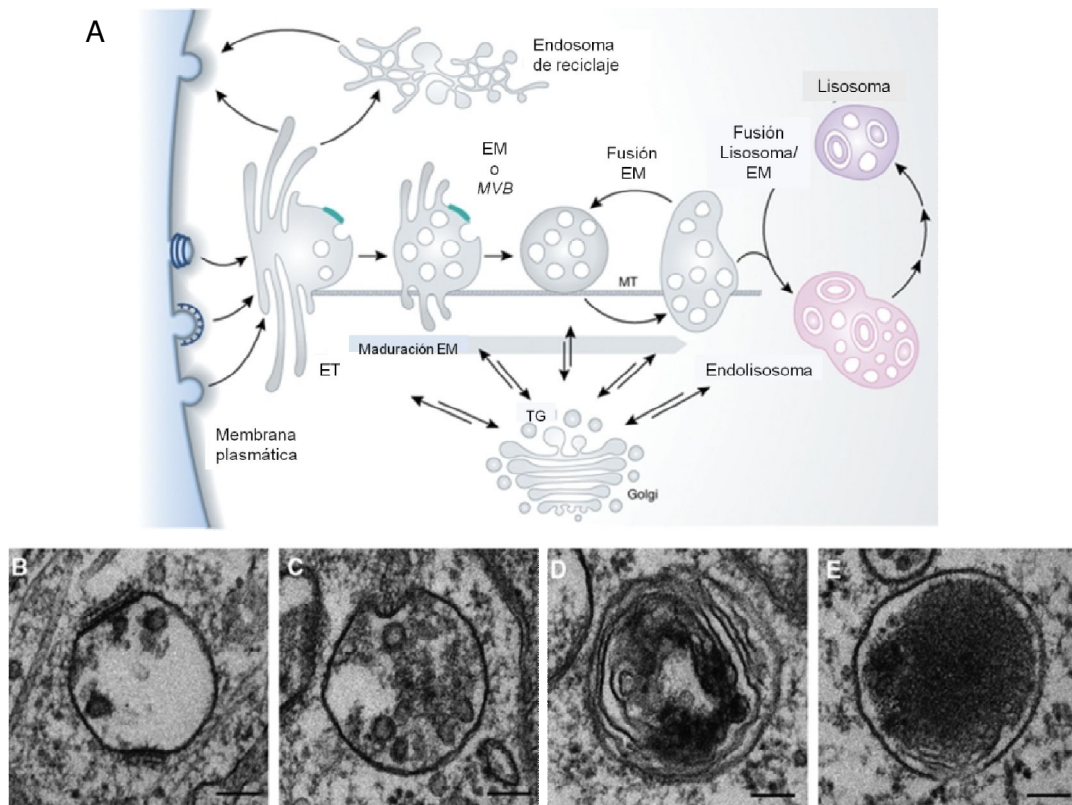
**Figura I16. Secuencia temporal (A-D) del reciclaje de una vesícula mediante *ultrafast endocytosis*.** A-D) Imágenes de microscopía electrónica de neuronas de hipocampo, 50, 100 y 300 ms después de la aplicación de un pulso despolarizante. Obsérvese la formación de una vesícula en la región adyacente a la zona activa. Compárese el tamaño de la estructura formada con el resto de vesículas sinápticas alrededor. E) Esquema del mecanismo *ultrafast endocytosis* A-D modificado de (Watanabe, Rost, et al., 2013); E de (Kononenko & Haucke, 2015)

#### 2.4.5. Maduración de los endosomas en las sinapsis.

Como se ha visto hasta ahora, los mecanismos de endocitosis juegan un papel clave en la regulación y la plasticidad de las sinapsis. De todos los "carga" endocitados como vesículas o endosomas, la mayor parte regresa de nuevo a la superficie plasmática (Bethani et al., 2009; Hoopmann et al., 2010). En algunas ocasiones, la membrana reciclada no vuelve a la superficie, sino que es degradada (Baixauli et al., 2014). Por lo tanto, el circuito de reciclaje está en equilibrio con el circuito de degradación que requiere de la participación de lisosomas (Fig. I17A).

Los endosomas o vesículas que no siguen en el circuito de reciclaje se fusionan entre sí formando endosomas tempranos (ET, Fig. I17B). Estos endosomas se enriquecen de la proteína citosólica Rab5 que favorece la formación de lípidos PIP3 y le da identidad y movilidad a través de microtúbulos (Huotari & Helenius, 2011). A estas estructuras se unen vesículas procedentes del *trans-Golgi* que contienen hidralasas para alcanzar una débil acidez (pH 6.8-5.9). Posteriormente estos endosomas tempranos maduran formando endosomas maduros (EM) con

diámetro de 250-1000 nm. Además se producen eventos endocíticos dentro de los propios endosomas, vía clatrina o a través de complejos proteicos (ESCRT, *endosomal sorting complex required for transport*), dando lugar a cuerpos multivesiculares (MVB, Fig. I17C).

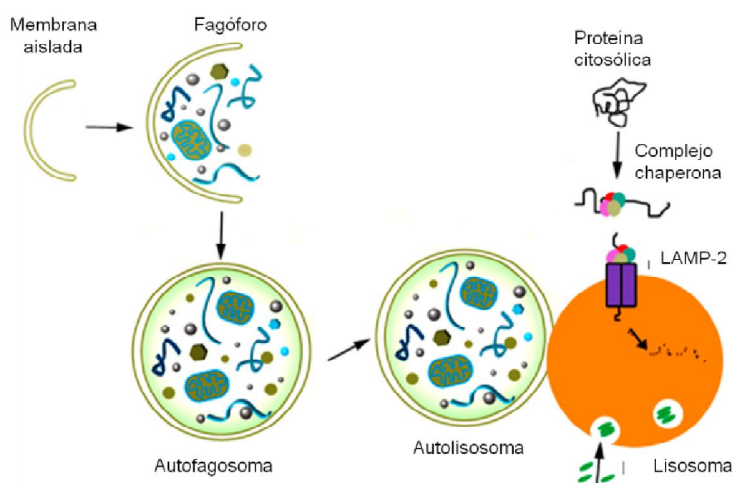


**Figura I17. Maduración de las membranas.** A) Sistema endosoma/ lisosoma. Los endosomas tempranos (ET) maduran (EM), formando cuerpos multivesiculares (MVB), y se acidifican por la anexión con vesículas del *trans-Golgi* (TG). Posteriormente se fusionan a lisosomas para degradar el contenido. B) Endosoma temprano con un CCP incipiente en la parte inferior, para formar un cuerpo multivesicular. C) Endosoma maduro formando un cuerpo multivesicular. D) Endolisosoma. E) Lisosoma primario con lumen electrodenso. A-E modificado de (Huotari & Helenius, 2011).

Aproximadamente 10-40 minutos después de la formación de los endosomas maduros, éstos se fusionan con lisosomas primarios para formar estructuras conocidas como endolisosomas o lisosomas secundarios. A partir de aquí, las estructuras membranosas siguen una única vía de degradación completa. Mientras algunos de los componentes de los endosomas maduros son degradados en el entorno lisosomal, otros permanecen y contribuyen al mantenimiento y generación de lisosomas, como por ejemplo proteínas del complejo SNARE. Los lisosomas secundarios contienen proteínas como LAMP 1 y 2, CD63, una gran cantidad de hidrolasas y en el lumen lípidos lentamente degradados que se presentan como membranas multilamelares replegadas (Fig. I17D).

Otro mecanismo que está relacionado con la formación de grandes estructuras degradadas vía lisosoma, es la autofagia (del griego, "comerse a sí mismo"). Estas macroestructuras incluyen componentes citoplasmáticos, organelas como mitocondrias, endosomas, vesículas y proteínas sinápticas de la superficie. La autofagia ocurre constitutivamente en neuronas bajo condiciones fisiológicas y es importante para múltiples procesos celulares (Nikoletopoulou et al., 2014): *i)* promueve la eliminación de orgánulos dañados para ayudar a las células a adaptarse a cambios en los nutrientes y mantener la homeostasis; *ii)* tiene un rol crítico en la inmunidad pues participa en la prevención de la acumulación de proteínas tóxicas o microbios invasores; *iii)* previene la acumulación de proteínas anormales que pueden alterar las funciones neurales y favorecer la neurodegeneración (enfermedades de Alzheimer, Parkinson o Huntington; Son et al., 2012); *iv)* participa en la eliminación sináptica en el sistema nervioso en desarrollo; *v)* contribuye al tamaño axonal y sináptico; y *vi)* participa en la plasticidad sináptica, favoreciendo una depresión a largo plazo.

La macroautofagia conlleva la formación de las estructuras membranosas que se conocen como autofagosomas, que incluyen a otras estructuras, fusionándose finalmente con lisosomas para formar los autolisosomas y degradar el contenido. La característica morfológica principal de un autofagosoma es la doble membrana. El autofagosoma formado se transporta por microtúbulos, fusionándose a endosomas y finalmente a lisosomas (Fig. I18).



**Figura I18. Maduración de los endosomas.** Sustratos secuestrados por la membrana aislada (fagóforo), que se elonga y rodea completamente hasta formar el autofagosoma, que se une al lisosoma formando el autolisosoma. Modificado de (Nikoletopoulou et al., 2014).

En general los lisosomas (Fig. 17E) son los orgánulos necesarios para la degradación final de los "carga", debido a su gran acidez en el lumen, pH 4.5-5.



## 2.5. ALTERACIÓN DE LA FISIOLOGÍA ENDOCÍTICA EN EL TERMINAL PRESINÁPTICO.

Una vez conocidos los mecanismos endocíticos y las dinámicas de las membranas en el terminal presináptico, aún queda por descifrar qué importancia tiene cada uno sobre la plasticidad sináptica, y en qué momento opera uno u otro. Para desvelar estas preguntas, la forma más sencilla es manipular experimentalmente las proteínas que participan en cada uno de ellos. Sin embargo, apenas se conocen las moléculas que participan en *bulk-*, *ultrafast-* o *"kiss-and-run"*, aunque sí las que participan en CME. La inhibición experimental del mecanismo CME ha desvelado su gran importancia en el mantenimiento de la fisiología presináptica (Royle & Lagnado, 2010), e incluso ha favorecido la activación de otras formas de endocitosis como *bulk-endocytosis*. Modificando el paradigma de estimulación, por ejemplo pasando de una baja a una alta frecuencia de potenciales de acción, se pueden observar los mismos fenómenos que los ocurridos con la manipulación experimental de CME. Por lo tanto se plantea la siguiente pregunta, ¿está CME afectada por la actividad neuronal, de modo que su saturación permite la activación de otros mecanismos endocíticos, terminando en una alteración la plasticidad presináptica?

### 2.5.1. Manipulación experimental de la endocitosis mediada por clatrina.

La importancia del mecanismo CME reside en el entramado de proteínas que participan y en la alta cooperatividad entre ellas (McMahon & Boucrot, 2011). Debido a que clatrina es el principal componente estructural para formar jaulas de endocitosis, por tanto, se debe encontrar a alta concentración en las sinapsis. La gran importancia de esta proteína se demuestra en numerosos trabajos de las últimas décadas, por varias razones: *i)* la inviabilidad de mutaciones o del *knock-out* de clatrina (Heerssen et al., 2008), *ii)* un enriquecimiento en los terminales sinápticos (Saheki & De Camilli, 2012) y *iii)* su inhibición bloquea totalmente la endocitosis (Balaji & Ryan, 2007; Hua et al., 2013).

Existen diversas maneras de bloquear clatrina (tabla I3). Por ejemplo, mediante fotoinactivación con FIAsh-FALI (Heerssen et al., 2008), utilizando un RNA de interferencia (Granseth et al., 2006; Zhu, Xu, & Heinemann, 2009), o usando inhibidores farmacológicos como clorpromazina (Kasproicz et al., 2008) o *pitstop* (von Kleist et al., 2011). En todos los casos se inhibe la formación de jaulas de

endocitosis tanto a partir de la superficie plasmática como a partir de endosomas. Pero se observa la activación de otros mecanismos compensatorios, como *bulk endocytosis*, además de un retraso en la cinética endocítica, favoreciendo la reducción de los depósitos de las vesículas y la subsecuente depresión sináptica.

La inhibición de otras proteínas involucradas en la CME, pero diferentes de clatrina, también generan el bloqueo de este mecanismo. Pero además, pueden impedir los mecanismos compensatorios que comparten etapas o proteínas específicas con CME. Este es el caso de dinamina, la proteína encargada de la escisión desde la superficie de las vesículas y los endosomas reciclados. Un estudio en la NMJ de *Drosophila* con el fenotipo *shibire* (mutación en dinamina cuya acción es sensible a la temperatura), demuestra que en condiciones de temperatura no-permisiva, los CCPs quedan retenidos en la superficie plasmática y también grandes invaginaciones membranosas con CCPs sin escindir (Koenig & Ikeda, 1989, 1996). Estos resultados sugieren un papel importante de dinamina en CME y *bulk-endocytosis*. En la tabla I3 se resume otras proteínas manipuladas para estudiar la importancia del mecanismo CME.

Proteína	Manipulación	Neurona/Especie	Conclusión efecto de los estudios
Clatrina	RNAi para CHC	-Hipocampo (rata)	-Bloqueo del reciclaje tras breve estimulación -Mezcla de bloqueo parcial y total del reciclaje
	Fotoinactivación FIAsh-FALI	-NMJ ( <i>Drosophila</i> )	-Menos eventos sinápticos registrados durante estimulación repetida -No se reciclan VSS a partir de membrana, ni a partir de los endosomas que sí se forman.
	Perfusión del dominio N-terminal de CHC	-C. bipolares retina (pez de color)	-Bloqueo de la endocitosis lenta ( $\zeta \sim 10$ s)
Dinamina	Dynasore	-Hipocampo (rata) -Calyx of Held (rata)	-Completo bloqueo del reciclaje
	Péptido de interferencia	-Calyx of Held (ratón)	-Bloqueo del reciclaje
	Análogos de GTP	-C.bipolar retina (pez) -Calyx of Held (ratón)	-Bloqueo de endocitosis rápida y lenta -Bloqueo de la endocitosis
	Ratón knock-out	-Corteza (ratón)	-Bloqueo incompleto del reciclaje
Anfifisina	Péptido de interferencia	-C. bipolares retina (pez de color)	-Bloqueo de la endocitosis lenta ( $\zeta \sim 10$ s)
AP2	ARNi para $\mu 2$	-Hipocampo (rata)	-Efectos menores. Posible compensación AP1
	Pépt. interferencia	-Calyx of Held (rata) - C.bipolar retina (pez)	-Bloqueo completo del reciclaje -Bloqueo de la endocitosis lenta ( $\zeta \sim 10$ s)
AP1	Ratón knock-out	-Hipocampo (ratón)	-Leve retraso en reciclaje. Rol interno?
PIP(4,5)P2	PIP1 $\gamma$ - KO	-Corteza (ratón)	-Reciclaje más lento de sinaptopHluorina
Sinaptojanina	Knock-out	-Corteza (ratón)	-Reciclaje más lento de sinaptopHluorina
	Alelo nulo	-NMJ ( <i>Drosophila</i> )	-Evidencia de un reciclaje más lento
Endofilina	Alelo nulo	-NMJ ( <i>Drosophila</i> )	-Evidencia de un reciclaje más lento
Auxilina	Knock-out	-Hipocampo (ratón)	-Reciclaje más lento de sinaptopHluorina
Estonina 2	Expresión de constructos dominante-negativo	-Hipocampo (rata)	-Efecto en el reciclaje de sinaptotagmina. -Ningún efecto en la cinética de endocitosis

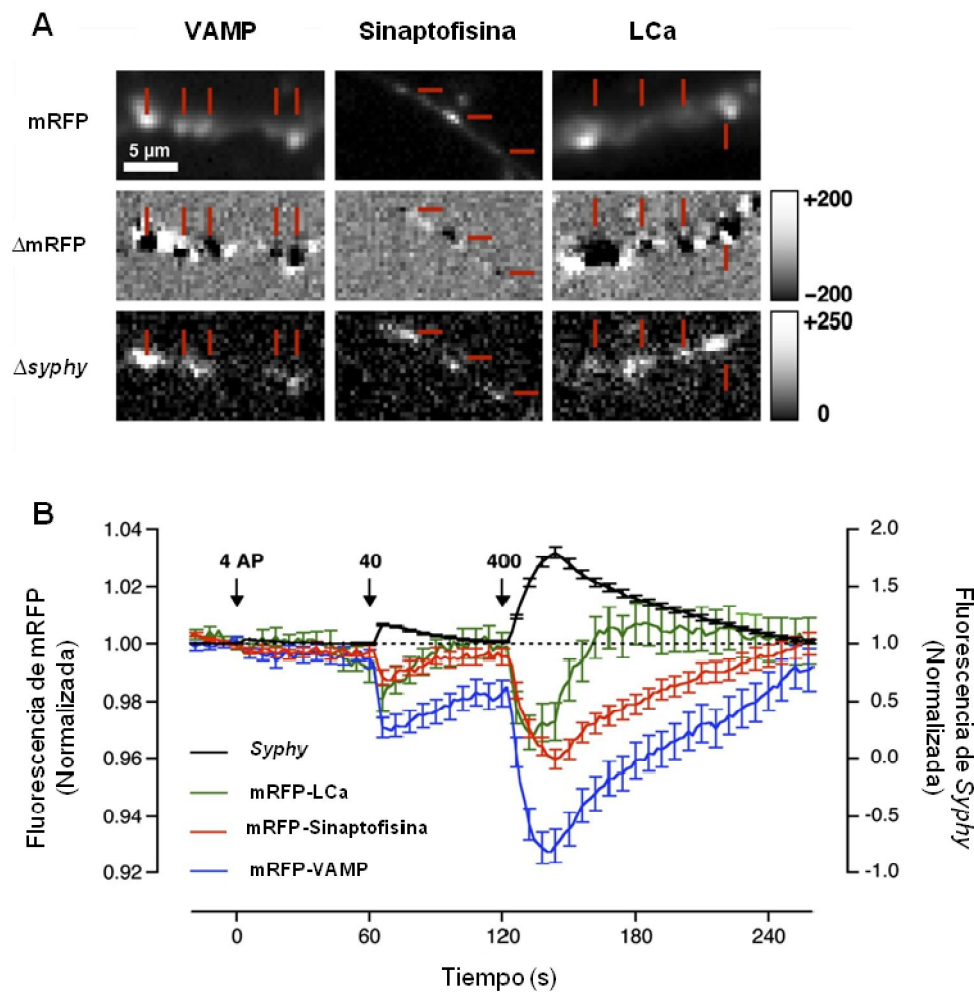
**Tabla I3. Efectos de la manipulación experimental del mecanismo CME (Royle & Lagnado, 2010).**

Así, de todas las proteínas de CME, los adaptadores pueden, o no, ser exclusivos de este mecanismo. En cambio clatrina sólo participa en CME. Y su disponibilidad y reclutamiento son el factor limitante para la cinética de endocitosis y para la fidelidad de las vesículas formadas (Takamori et al., 2006; Wilhelm et al., 2014).

### **2.5.2. La disponibilidad de clatrina en el terminal presináptico.**

Clatrina supone el 0.75% del total de proteínas en neuronas (Goud et al., 1985), y está concentrada principalmente en sinapsis en la forma soluble de *triskelion* (Saheki & De Camilli, 2012). Si una célula contiene  $\sim 0.5-1 \cdot 10^6$  *triskelion* (Doxsey et al., 1987), teniendo en cuenta que la jaula de endocitosis requiere de 36-60 *triskelion* (Cheng et al., 2007), se podrían formar entre 1000-4500 nuevas vesículas. Pero este límite máximo sería inferior, ya que algunos estudios en sinapsis centrales en reposo, demuestran que sólo el 15-25% de toda la clatrina se encuentra soluble en el citoplasma, frente al  $\sim 75\%$  ensamblada a estructuras, que tampona su disponibilidad (Goud et al., 1985; Hua et al., 2011). Estos datos varían entre distintos tipos de células nerviosas, pero indican que existe un reservorio limitado de clatrina disponible.

Además de una baja disponibilidad de clatrina, sus niveles pueden verse reducidos en períodos de actividad. Estudios con pHluorina y colorantes FM han demostrado que una tasa de exocitosis elevada, acumula una gran cantidad de membrana y proteínas vesiculares en la superficie, que difunden lateralmente saliendo incluso de la sinapsis hasta la superficie axónica (Sankaranarayanan & Ryan, 2000), o provocando intercambio con otros botones sinápticos (Li & Murthy, 2001; Darcy et al., 2006). Esta difusión fuera de la sinapsis genera el movimiento de proteínas solubles de la maquinaria endocítica que tienen que salir para reclutar sus "carga" en zonas lejanas a la región perisináptica. Por ejemplo, 400 estímulos a 20 Hz reducen  $\sim 4\%$  la clatrina disponible en el terminal presináptico (Fig. I19, Granseth et al., 2006), aunque no se conoce qué efecto tiene este fenómeno sobre la neurotransmisión.

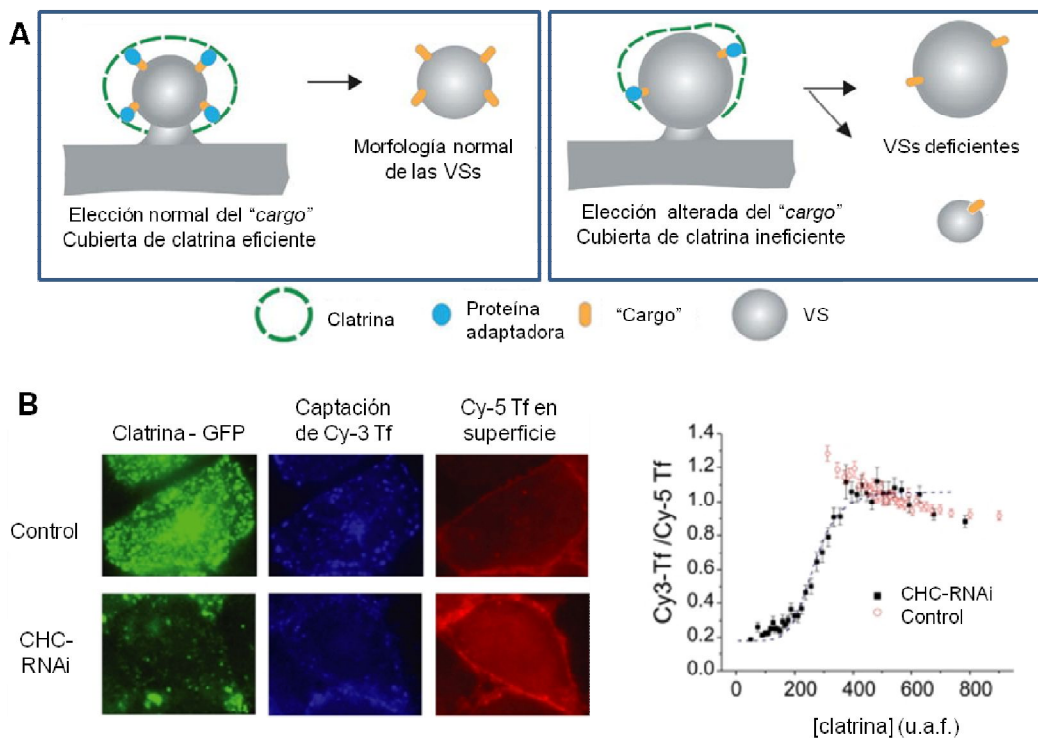


**Figura 119. Clatrina, VAMP y sinaptofisina salen de la sinapsis durante estimulación.** A) (Arriba) Axones de neuronas co-transfectadas con *syphy* y sendas construcciones mRFP-VAMP, mRFP-sinaptofisina o mRFP-LCa, donde mRFP es la proteína roja fluorescente en ratón y LCa es la cadena ligera de clatrina tipo a. La fluorescencia de *syphy* indica un incremento de material vesicular en superficie durante la estimulación (abajo), y la fluorescencia de mRFP indica una disminución de las proteínas en la sinapsis y una acumulación en las regiones perisinápticas, como se ve en la imagen de la diferencia entre la estimulación y el reposo (centro). B) Cambio en la fluorescencia de mRFP, que indica una disminución en la sinapsis de clatrina, VAMP y sinaptofisina en función de la estimulación. Modificado de (Granseth et al., 2006).

### 2.5.3. La cooperatividad de clatrina en el terminal presináptico.

La unión inicial de AP2-clatrina (estequiometría 2:1) favorece la sucesiva llegada de proteínas adaptadoras y *triskelion* en un proceso cooperativo (Cocucci et al., 2012). Una desorganización en la abundancia o composición de las proteínas de las vesículas sinápticas o incluso en las proteínas adaptadoras, altera la formación de la cubierta de clatrina que afectará finalmente al tamaño de la vesícula (Fig. 120A, Poudel & Bai, 2014).

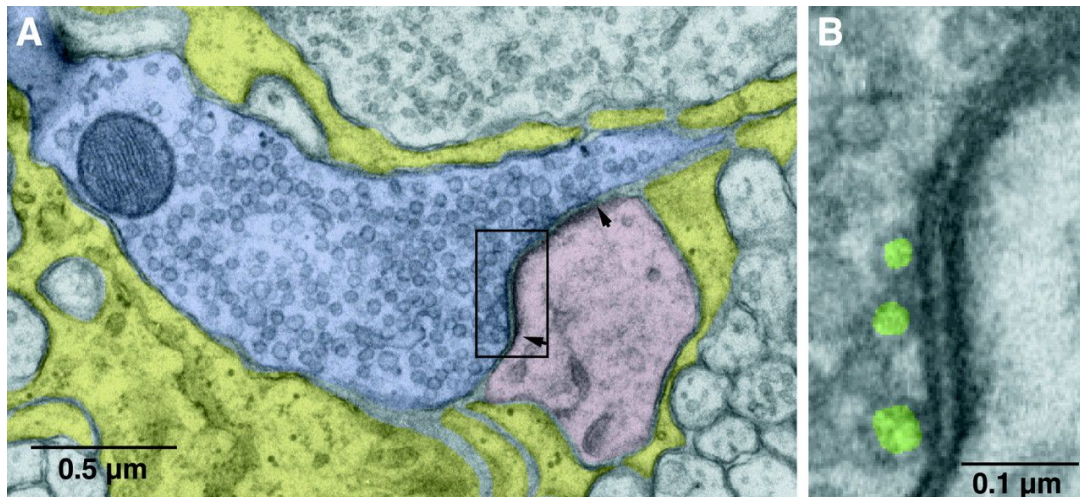
A pesar de su importancia a nivel teórico, no se conoce experimentalmente la relación entre la cantidad de clatrina disponible y su efecto sobre la neurotransmisión. El estudio más relevante es en células no neurales en el que se hace el análisis correlativo de la endocitosis del receptor de transferrina (TfR) en función de la cantidad de clatrina manipulada mediante RNAi y determinada por inmunofluorescencia (Moskowitz et al., 2005). Los resultados muestran una alta cooperatividad de clatrina en la endocitosis ya que pequeñas disminuciones en su expresión conllevan discrepancias significativas en el reciclaje de TfR (Fig. I20B).



**Figura I20. La cooperatividad de clatrina en la formación de vesículas y en el reciclaje de los "carga".** A) Efecto del reclutamiento y disponibilidad de las proteínas adaptadoras sobre la correcta formación de las vesículas sinápticas. B) Internalización de transferrina (Cy3-Tf, en azul) mediante el control altamente cooperativo que clatrina ejerce sobre la endocitosis de su receptor (Cy5 Tf, en rojo), en células no neurales. Los niveles endógenos de clatrina (en verde) se manipulan con un RNAi. La endocitosis depende de los niveles de clatrina y se ajusta a una ecuación de Hill simple con un coeficiente de 6.25. A modificado de (Poudel & Bai, 2014); B de (Moskowitz et al., 2005).

### 3. LA PROBABILIDAD DE LIBERACIÓN Y EL RRP, COMO PRIMER RECURSO DE LA NEUROTRANSMISIÓN.

El RRP es el primer depósito en liberarse, y por lo tanto es el responsable de los fenómenos plásticos de depresión o facilitación frente a períodos de actividad (Zucker & Regehr, 2002). Este depósito se ha asociado a las vesículas ancladas a la zona activa (Fig. I21). Por ello, ha sido ampliamente estudiado con diferentes técnicas.



**Figura I21. RRP observado en la ultraestructura de un terminal presináptico.** A) Terminal axónico de una fibra trepadora cerebelar (azul) sobre la espina de una dendrita de una célula de Purkinje (rosa). El sitio de liberación contiene una mitocondria y está rodeado de glía (amarillo). Se recuadra una parte de la ZA, que queda limitada entre las dos flechas. B) Primer plano del área recuadrada en A en el que se reflejan VSs ancladas a la ZA (verde). Modificado de (Xu-Friedman, Harris, & Regehr, 2001).

### 3.1. PROBABILIDAD DE LIBERACIÓN Y SU EFECTO SOBRE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA.

La probabilidad de liberación ( $Pr$ , escala de 0 a 1) es la probabilidad de liberar una vesícula del RRP cuando llega un potencial de acción. El calcio juega un papel altamente cooperativo en la exocitosis de las vesículas (Rahamimoff & Dodge, 1969; Lou et al., 2005), por lo tanto, la  $Pr$  depende del calcio y de su acoplamiento con la maquinaria exocítica (Nakamura et al., 2015). Dicha capacidad de acoplamiento varía durante la maduración sináptica. Las sinapsis más inmaduras suelen operar a probabilidades de liberación altas,  $Pr \geq 0.5$ , y las maduras a probabilidades bajas,  $Pr \leq 0.5$  (Xu-Friedman & Regehr, 2003), influyendo en la plasticidad a corto plazo frente a períodos de actividad.

La respuesta postsináptica evocada por la cantidad de vesículas liberadas, depende del calcio intracelular en el terminal presináptico de la siguiente manera:  $EPSP = cte[Ca^{+2}]_{int}^4$  (Rahamimoff & Dodge, 1969). Y la  $[Ca^{+2}]_{int}$  se relaciona con la  $[Ca^{+2}]_{ext}$ , ya que el ión pasa por difusión facilitada a través de los canales de calcio presinápticos, saturándose a altas concentraciones de  $[Ca^{+2}]_{ext}$  (Schneppenburger et al., 1999). Por lo tanto, la  $Pr$  se puede modificar experimentalmente cambiando la  $[Ca^{+2}]_{ext}$  (Rahamimoff & Dodge, 1969). Se ha determinado que 2 mM de  $[Ca^{+2}]_{ext}$  es una concentración fisiológica para realizar los experimentos.

En un principio, se había sugerido que la probabilidad de liberación dependía directamente del tamaño del RRP (Stevens & Tsujimoto, 1995; Rosenmund & Stevens, 1996; Schneggenburger et al., 1999). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la Pr hace que el RRP se libere más rápida o lentamente, independientemente de su tamaño (Fig. I22B, Xu-Friedman & Regehr, 2003). Así, cuando la  $[Ca^{+2}]_{ext}$  es elevada, la probabilidad de liberación se incrementa y el RRP se vacía de forma muy eficiente. Cuando la  $[Ca^{+2}]_{ext}$  es baja, ocurre lo contrario. Dos ejemplos lo demuestran. El primero se encuentra en las NMJs del cangrejo de río americano innervadas por dos tipos de motoneuronas, unas que operan de forma fásica y otras de forma tónica. Cuando ambas eran estimuladas a baja frecuencia, las sinapsis fásicas evocaban potenciales ~450 veces mayores que las tónicas. Paradójicamente, las sinapsis fásicas tenían un tamaño del RRP casi tres veces inferior al estimado en las tónicas (Millar et al., 2002). El otro ejemplo aparece entre las fibras paralelas y las trepadoras que contactan con las células de Purkinje en el cerebelo. Las primeras operan a una  $Pr < 0.1$ , y las segundas a  $Pr \sim 0.4-0.9$  favoreciendo un fenotipo depresivo. Sin embargo, ambos tipos de terminales tienen un número similar de vesículas ancladas a la zona activa (Dittman et al., 2000).

Por lo tanto, la probabilidad de liberación es una propiedad intrínseca de cada sinapsis. Una manera de evaluar la Pr promedio a la que operan las sinapsis de una neurona es aplicar un protocolo de pulsos pareados (PPP, *paired-pulse protocol*) con un intervalo de tiempo corto (<5 s). Los cambios sinápticos observados en un período de tiempo tan corto, han sido asociados a cambios en el terminal presináptico (Zucker & Regehr, 2002). En consecuencia, este paradigma permite estudiar la plasticidad presináptica, y pueden ocurrir dos fenómenos (Fig. I22A, tabla I4), facilitación (PPF, *paired-pulse facilitation*) ó depresión (PPD, *paired-pulse depression*):

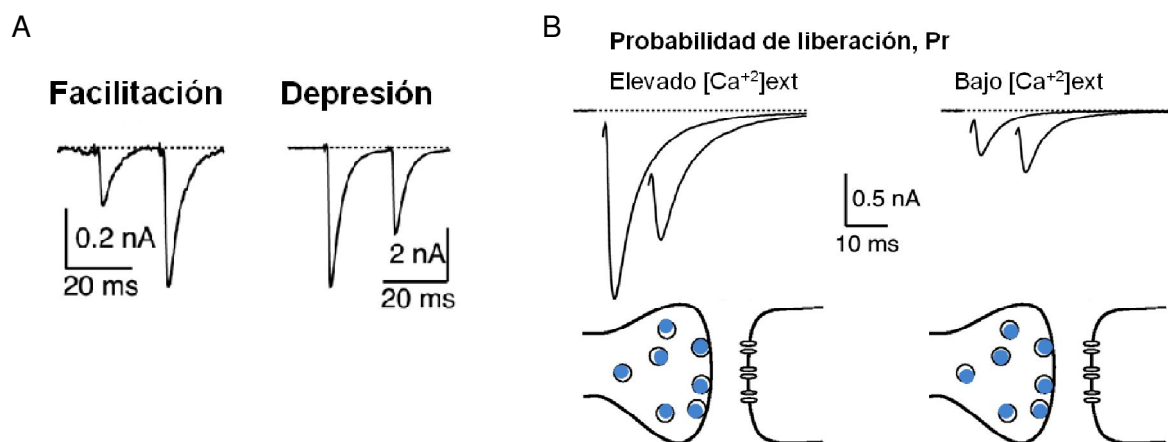
i) *Paired-pulse facilitation*, se produce cuando el segundo pulso genera una respuesta sináptica mayor que el primer pulso. La facilitación se produce en sinapsis que parten con una probabilidad de liberación baja.

ii) *Paired-pulse depression*, se produce cuando el segundo pulso genera una respuesta sináptica menor que el primero. La depresión se produce en sinapsis que parten con una probabilidad de liberación alta, y puede deberse a dos causas principales, el vaciado del depósito del RRP con el primer estímulo, o a la inactivación de los canales de calcio.

Pr al que opera un terminal presináptico	Plasticidad a corto plazo que favorece	Referencia
Baja (<0.4)	Facilitación	(Dobrunz & Stevens, 1997)
Alta ( $\geq 0.4$ )	Depresión	(J. S. Dittman et al., 2000)

**Tabla I4. Fenómenos de plasticidad a corto plazo en función de la probabilidad de liberación.**

Los fenómenos de facilitación y depresión pueden darse de forma sucesiva en un mismo período de actividad, ya que la propia sinapsis puede ajustar su Pr por retroalimentación (Branco & Staras, 2009).



**Figura I22. Efecto de la probabilidad de liberación sobre la plasticidad presináptica.** El protocolo de pulsos pareados permite estudiar la plasticidad a corto plazo. A) Fenómenos de facilitación y depresión. B) Variación de la probabilidad de liberación en una misma sinapsis, modificando el calcio extracelular. Los fenómenos de plasticidad son independientes del tamaño del RRP (Xu-Friedman & Regehr, 2003).

En resumen, la liberación del RRP depende de la probabilidad de liberación. Sin embargo, el tamaño del RRP varía durante el desarrollo, en paralelo a otras propiedades sinápticas.

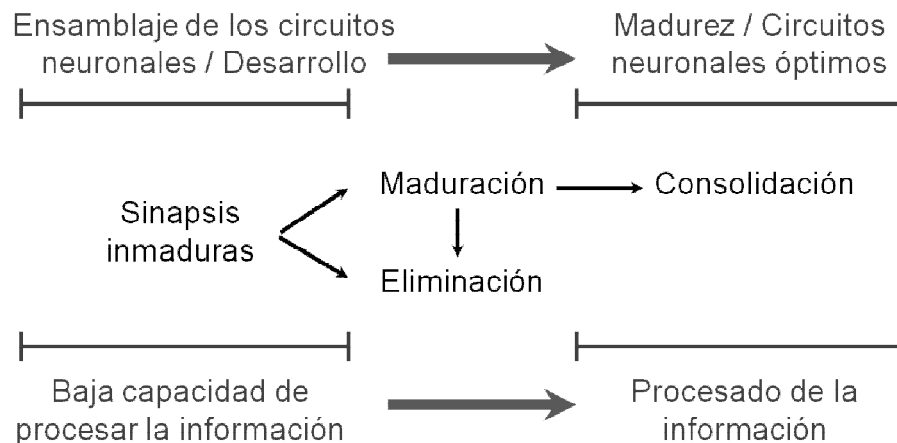
#### 4. REFINAMIENTO DURANTE EL DESARROLLO DE LAS SINAPSIS: MADURACIÓN Y ELIMINACIÓN SINÁPTICA

Toda la fisiología presináptica detallada hasta el momento puede explicar los fenómenos de plasticidad observados en los terminales funcionales de neuronas maduras. Pero desde el establecimiento de las sinapsis hasta que comienzan a ser funcionales y alcanzan la madurez, se producen numerosos cambios. Se generan cambios en la composición y en el agregado de proteínas y lípidos de los terminales.



Asimismo, se reorganiza el citoesqueleto y las proteínas de la matriz extracelular que estructuran la sinapsis (Garner, et al., 2006).

De la misma forma que los contactos sinápticos pueden estabilizarse y reforzarse, también pueden eliminarse. Por lo tanto, ambos fenómenos, maduración y eliminación sináptica, forman parte del proceso de refinamiento y plasticidad del sistema nervioso.

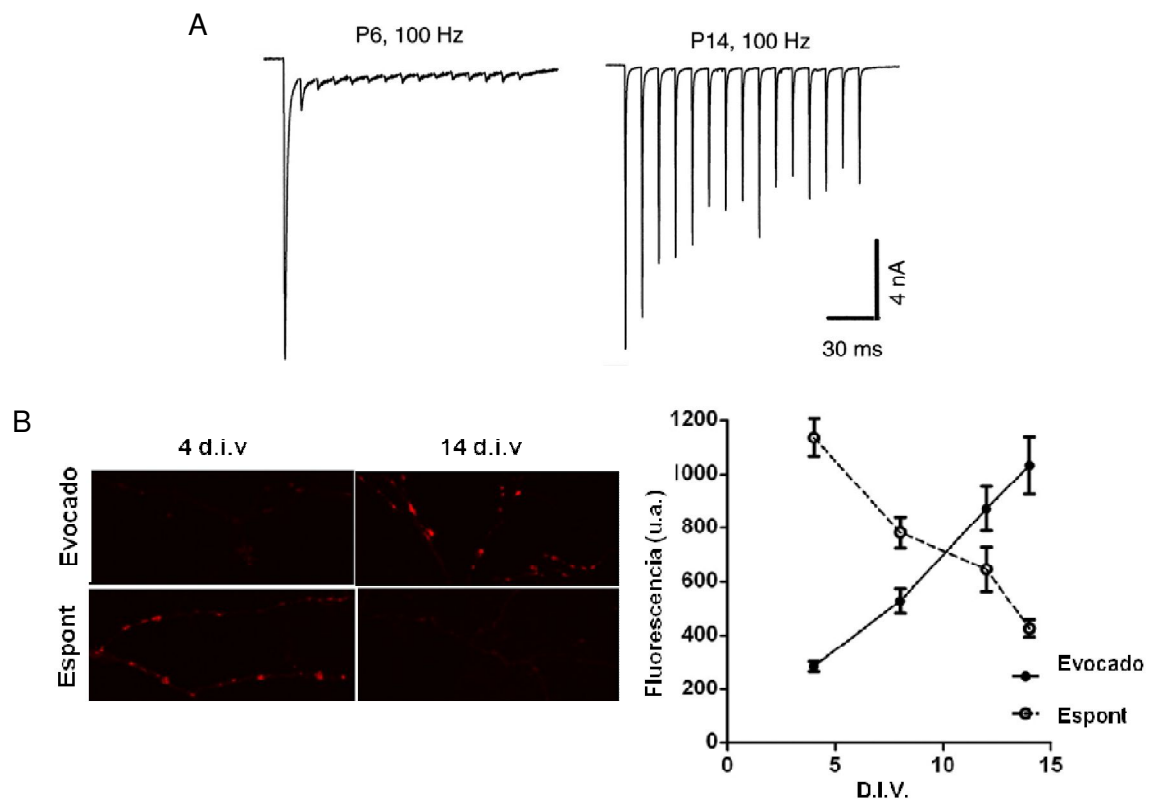


La participación de las células gliales en este refinamiento es evidente. Numerosos estudios demuestran un rol de la glía central y periférica en la actividad sinaptogénica y en la maduración sináptica a través de factores secretados (Freeman, 2005). Este hecho ha sido demostrado en la NMJ de *Xenopus* (Peng et al., 2003), en motoneuronas en cultivo (Ullian et al., 2004), en microcultivos de neuronas gabaérgicas (Hughes et al., 2010), en neuronas ganglionares de la retina (Christopherson et al., 2005; Nägler et al., 2001; Ullian et al., 2004), en cultivos de hipocampo (Hughes et al., 2010; Pyka et al., 2011) y en cultivos organotípicos de neuronas del sistema auditivo embrionario de pollo (Korn et al., 2012), entre otros.

Más allá del papel muy bien detallado en la formación y maduración de las sinapsis, la glía juega un papel activo en la eliminación de contactos neuronales. Sin embargo, esta función es muy desconocida. Existe un consenso generalizado en el que las células gliales fagocitan los restos neuronales desprendidos. Pero no se conoce cómo se desencadena el proceso. Podría ser un mecanismo autónomo de la neurona o comenzar por la liberación de algún factor secretado por la glía.

#### 4.1. ASPECTOS FUNCIONALES DE LA MADURACIÓN PRESINÁPTICA.

Existen diferencias funcionales significativas entre una sinapsis inmadura y otra madura. Los potenciales y corrientes postsinápticos evocados en las sinapsis inmaduras presentan una amplitud reducida y una cinética más lenta (Taschenberger & von Gersdorff, 2000), probablemente por una menor cantidad de canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Wang et al., 1998) o de receptores postsinápticos.



**Figura I23. Resumen de los cambios funcionales de las sinapsis durante la maduración.** A) Potenciales evocados en el *Calyx of Held* frente a un tren de estímulos a 100 Hz en dos momentos del desarrollo. B) Marcaje de VAMP2 mediante biotina - estreptovidina para cuantificar el tamaño de los depósitos de vesículas que participan en la liberación espontánea ó evocada en neuronas de hipocampo en dos momentos del desarrollo. A modificado de (Taschenberger & von Gersdorff, 2000); B de (Andreae et al., 2012).

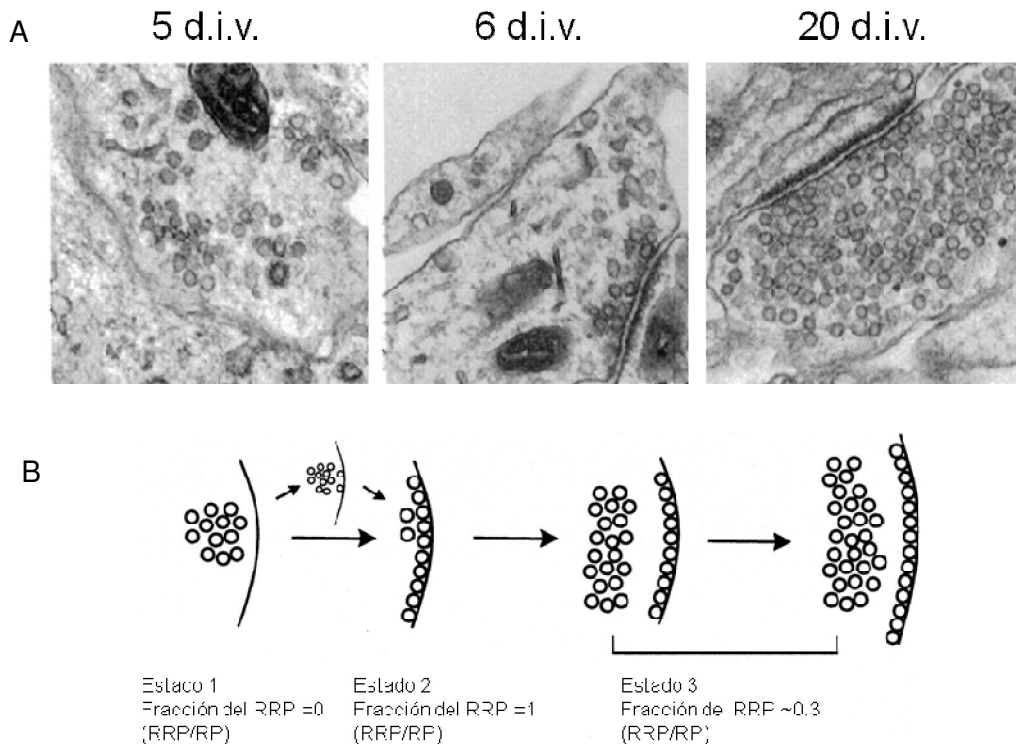
Las sinapsis inmaduras presentan una mayor depresión a corto plazo (Fig. I23A) en la respuesta evocada (Feldmeyer & Radnikow, 2009; Taschenberger & von Gersdorff, 2000). Además, operan a una elevada probabilidad de liberación (Furshpan, et al., 1986). Por ejemplo en neuronas piramidales de hipocampo de P4-8, la Pr es ~0.9, frente a una Pr<0.5 cuando las células son P14-28 (Wasling, et al., 2004). Incluso, durante la maduración, existe una transición de canales de calcio tipo N a los tipo P/Q en la zona activa (Pravettoni et al., 2000; Scholz & Miller, 1995), que junto con deficiencias en el tamponamiento del  $[Ca^{+2}]_{int}$  puede explicar el fenotipo.

Finalmente, las sinapsis inmaduras presentan una elevada actividad espontánea (Fig. I23B, Andreae et al., 2012). Así, se sugiere que la actividad espontánea es una forma de comunicación más primaria en la que no resulta tan importante el procesamiento de la información, sino que haya comunicación.

Los cambios funcionales van asociados a cambios morfológicos observados tanto por microscopía óptica como electrónica. Durante la maduración hay un crecimiento del tamaño de los terminales pre- y postsinápticos. Este fenómeno ha sido observado en todas las sinapsis, y ha sido bien descrito en microcultivos de neuronas del ganglio cervical superior (SCG) de rata (Furshpan et al., 1986; Rees, et al., 1976), modelo *in vitro* en el que se ha desarrollado esta tesis doctoral. El crecimiento comienza con el transporte de depósitos membranosos desde el aparato de Golgi, a través de microtúbulos, para fusionarse finalmente con la superficie plasmática (Rizzoli, 2014).

Las neuronas inmaduras sufren un desarrollo de los depósitos de vesículas sinápticas en el terminal presináptico. El incremento de la superficie del terminal presináptico, ocurre en paralelo al enriquecimiento de proteínas sinápticas también procedentes del soma celular, donde se sintetizan (Wilhelm et al., 2014). El proceso de reclutamiento y organización de las proteínas precisa de un mecanismo de endocitosis que permita la generación eficiente de vesículas: CME. Sin embargo, al igual que las proteínas sinápticas, las de la maquinaria endocítica también tienen que ser sintetizadas y alcanzar las sinapsis para concentrarse en los terminales. Por lo tanto, el crecimiento de los depósitos de vesículas es progresivo durante el desarrollo, y la endocitosis, nuevamente, resulta el factor limitante para tal fin.

El desarrollo de los depósitos *in vitro* queda perfectamente definido en un trabajo en neuronas piramidales de hipocampo a diferentes días en cultivo (Mozhayeva et al., 2002), donde se observa una progresión en tres etapas (Fig. I24). Primero se forma un depósito de reciclaje que no se encuentra anclado a la membrana, y tiene una probabilidad de liberación  $\sim 0$ , haciendo a la sinapsis, aún, silente. Después, los terminales presentan RRP, que supone  $\sim 35\%$  del total de vesículas. Finalmente se produce un aumento del tamaño del depósito de reciclaje, incluido el RRP, y también aparece el depósito de reserva. Este último permite el repuesto de vesículas de los otros reservorios. En este punto, las vesículas del RRP suponen  $\sim 20\%$  del total con capacidad de reciclarse, y presenta una probabilidad de liberación más baja.



**Figura I24. Desarrollo de los depósitos de vesículas del terminal presináptico con la maduración.** A) Organización morfológica de los depósitos de vesículas sinápticas de terminales presinápticos de neuronas de hipocampo en cultivo durante 5, 6 y 20 días. B) Modelo secuencial que muestra cómo se organizan los depósitos de vesículas durante el desarrollo sináptico. Modificado de (Mozhayeva et al., 2002).

Pero partiendo de depósitos reducidos para llegar a generar grandes reservorios de vesículas sinápticas a partir de la superficie plasmática, debe existir también un perfeccionamiento de la endocitosis durante la maduración sináptica, para favorecer el balance exo-endocitosis.

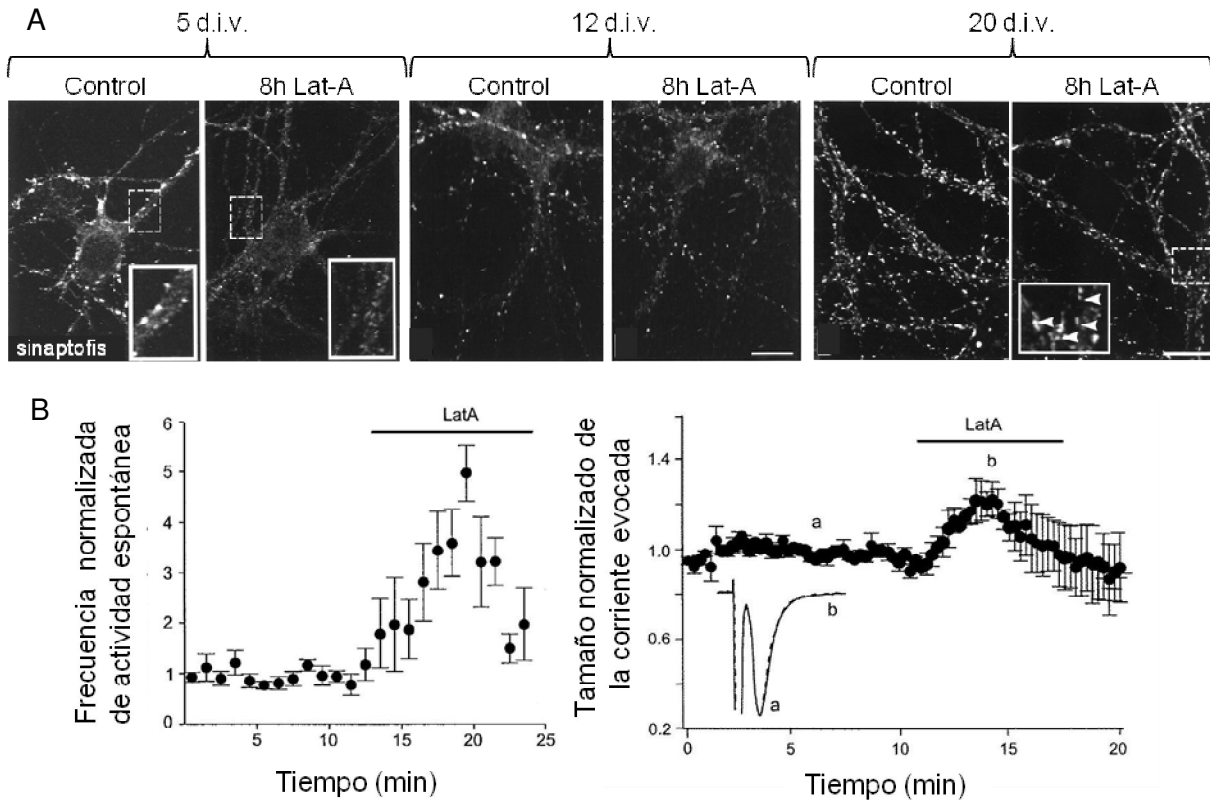
Por ejemplo, en el *Calyx of Held* una fuerte exocitosis da comienzo a la audición, y es el momento en el que se adquiere una capacidad progresiva para el reciclaje de las vesículas sinápticas. Así mientras en células auditivas inmaduras de de ratón, la  $\tau_{\text{endo}}$  es de decenas de segundos, reciclando  $0.2 \text{ vesículas} \cdot \text{s}^{-1}$  en una zona activa, en neuronas maduras se reciclan  $7.2 \text{ vesículas} \cdot \text{s}^{-1}$  con  $\tau_{\text{endo}} \sim 15 \text{ s}$  (Renden & von Gersdorff, 2007). De forma similar, en los botones sinápticos de la colateral de Schaffer se observa una marcada diferencia también en la tasa de endocitosis entre neuronas inmaduras,  $0.9 \text{ vesículas} \cdot \text{s}^{-1}$  por zona activa, frente a las maduras,  $5.7 \text{ vesículas} \cdot \text{s}^{-1}$  (Rose et al., 2013). Además, este trabajo pone en cuestión la existencia de un depósito de reserva de vesículas en sinapsis maduras que sí aparece en las inmaduras o en condiciones fisiopatológicas.

En general, los fenómenos funcionales y morfológicos indican que las sinapsis inmaduras son estructuralmente más plásticas que las sinapsis maduras, ya que pueden madurar y reforzarse, debilitarse o incluso eliminarse. Por el contrario, las sinapsis maduras son estables y los cambios plásticos que sufren afectan a su actividad, pero no a su estructura.

#### **4.1.1. El papel del citoesqueleto de actina en la maduración presináptica**

Numerosos estudios demuestran que el citoesqueleto de actina es una pieza estructural clave para el refinamiento sináptico ya que es rígido pero a la vez dinámico. Su papel en la sinapsis ha sido caracterizado mediante el uso de fármacos que favorecen la despolimerización, como latrunculina-A (Lat-A) y citocalasina-D, o la estabilización de los filamentos, como jasplakinolida y faloidina (Cingolani & Goda, 2008; Dillon & Goda, 2005). Por ejemplo el uso de Lat-A, que es un fármaco procedente de una esponja marina que secuestra los monómeros de actina-G (Yarmola et al., 2000), incrementa la probabilidad de liberación (Fig. I25B, y ver Anexo VI) favoreciendo una intensa depresión (Morales et al., 2000). Esto le otorga un importante papel a la actina en el mantenimiento de la plasticidad a corto plazo (Krucker et al., 2000).

En sinapsis inmaduras la actina polimerizada (F-actina) está más presente en los terminales presinápticos que en los postsinápticos, donde predomina la actina monomérica (G-actina). Este fenotipo revierte cuando las sinapsis maduran (Zhang & Benson, 2002; Morales et al., 2000). Zhang y Benson describen en hipocampo, que el citoesqueleto de actina está fuertemente unido a los depósitos de reciclaje y reserva en terminales muy inmaduros, haciendo a la endocitosis muy dependiente de actina. Pero con la maduración, la actina deja de ser esencial, ya que la alteración del citoesqueleto no afecta a la endocitosis, ni a los depósitos de vesículas (Fig. I25A, Zhang & Benson, 2002).



**Figura 125. Efecto del citoesqueleto de actina sobre la neurotransmisión.** A) La estabilidad de las sinapsis y los depósitos de vesículas es muy dependiente del citoesqueleto de actina en neuronas inmaduras, y menos dependiente en sinapsis maduras. El citoesqueleto de actina se altera con Lat-A. Barra calibración, 27  $\mu\text{m}$ . B) Efecto funcional de la despolimerización de actina en neuronas centrales autápticas maduras. Con Lat-A aumenta la probabilidad de liberación, incrementándose tanto la actividad espontánea (izq), como la respuesta evocada (dcha). Este fenotipo indica que actina también juega un papel importante en la plasticidad de las sinapsis maduras. A modificado de (Zhang & Benson, 2001); B de (Morales et al., 2000).

Se ha sugerido que el papel de la actina durante la madurez presináptica es relevado por otras proteínas estructurales como Bassoon, Piccolo, ELKS/CAST, Munc13, RIM, liprina- $\alpha$  y sinapsina. El proceso viene regulado por moléculas extracelulares y de adhesión entre los terminales pre- y postsináptico, como integrinas, N-cadherinas ó neuroligina 1 (Wittenmayer et al., 2009). De esta forma, las sinapsis que no hagan bien la transición de la dependencia proteica de actina a otras proteínas estructurales, pueden quedar retenidas en un fenotipo inmaduro o incluso ser eliminadas (Lazarevic et al., 2011).

Como se ha visto, en los terminales presinápticos inmaduros la actina juega un papel esencial en el mantenimiento de depósitos de vesículas y en el reciclaje. Con la madurez, la actina sigue participando en la plasticidad de los terminales aunque existe gran controversia sobre su localización y función. Por ejemplo, un estudio en la sinapsis retículo-espinal de lamprea encuentra dos depósitos de actina: uno que

rodea al clúster de vesículas, únicamente para retenerlo, y que es sensible a Lat-A; y otro en la superficie plasmática adyacente a la zona activa, otorgándole un papel modulador en la exo-endocitosis, y que es sensible a faloidina (Bleckert et al., 2012). El resto de estudios, sólo ven uno de los dos depósitos descritos por Alford y colaboradores: un único depósito de actina presináptica, que sigue jugando un papel esencial en la exo-endocitosis a pesar de la madurez (Bloom et al., 2003; Bourne, Morgan, & Pieribone, 2006; Brodin & Shupliakov, 2006; Morales et al., 2000; Pieribone et al., 1995; Rosahl et al., 1995; Shupliakov et al., 2002); y un solo depósito que desempeña un papel de andamiaje, reteniendo de forma indirecta a los depósitos de vesículas sinápticas sin participar directamente en la función presináptica (Sankaranarayanan et al., 2003; Job & Lagnado, 1998).

La maduración sináptica termina con una consolidación o una eliminación de la sinapsis. El conjunto de evidencias presentadas sugiere que el citoesqueleto de actina es importante para esta transición. Su papel será investigado en esta tesis.

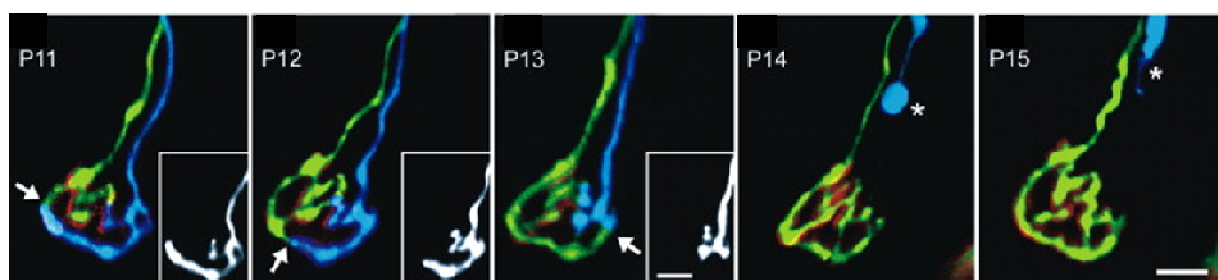
#### **4.2. ELIMINACIÓN SINÁPTICA.**

La eliminación de los contactos sinápticos es un fenómeno que se produce durante el desarrollo en paralelo a la formación de las sinapsis, y forma parte del refinado del sistema nervioso, hasta la madurez. Así, el número de sinapsis establecidas y maduras en el sistema nervioso es significativamente inferior al número de conexiones que se forman inicialmente (Mariani, 1983; Purves & Lichtman, 1980). Los mecanismos moleculares de este fenómeno selectivo son ampliamente desconocidos. Aunque sí se ha observado que la glía participa en la etapa final, fagocitando los restos axonales que se liberan durante la eliminación. Por tanto, el proceso no ocurre en un único paso sino que se da de forma secuencial y progresiva.

La eliminación sináptica se ha observado tanto en el sistema nervioso periférico como en el central. Las ventajas de estudiar este fenómeno en las sinapsis periféricas son el tamaño y la accesibilidad. Las sinapsis estudiadas en el periférico son: la NMJ (Bishop et al., 2004; Quattrocchi et al., 2003; Walsh & Lichtman, 2003) o las del ganglio cervical superior (Gan et al., 2003; Lichtman & Purves, 1980). En el sistema nervioso central también se ha estudiado en las sinapsis entre las fibras trepadoras y las dendritas de Purkinje (Kano & Hashimoto, 2009); en las sinapsis entre las neuronas del núcleo geniculado lateral y las ganglionares de la retina

(Chen & Regehr, 2000; Huberman, 2007); y las sinapsis entre el tálamo basal y la corteza somatosensorial (Arsenault & Zhang, 2006).

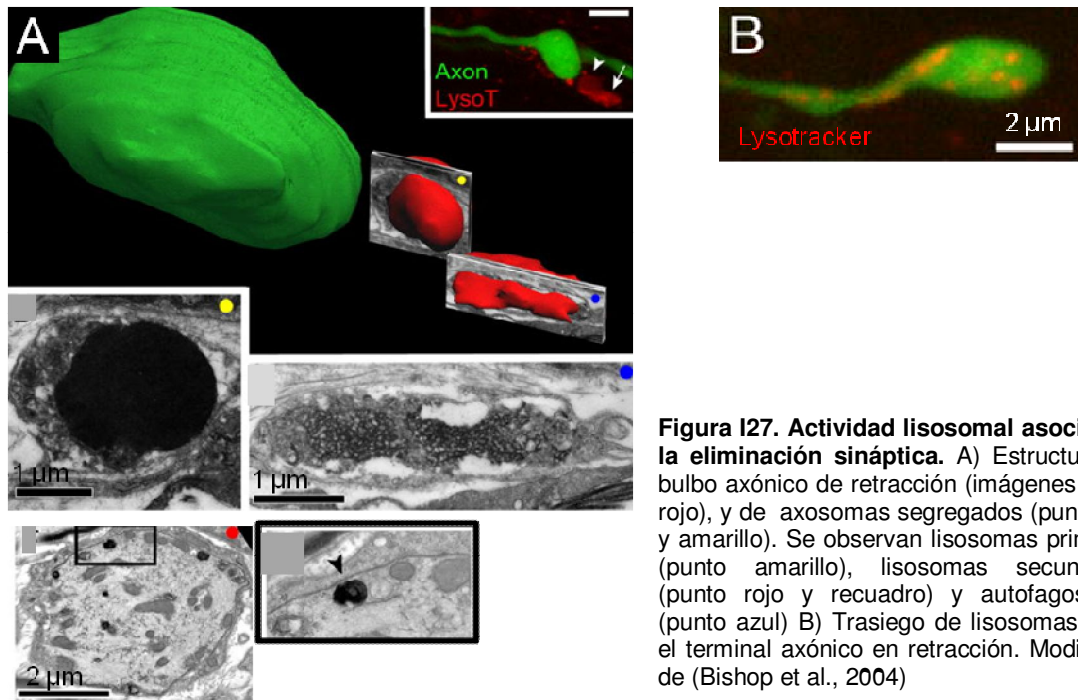
A continuación me centraré en describir la eliminación sináptica en la NMJ de ratón, como modelo de sinapsis colinérgica. El proceso ha sido ampliamente estudiado por el Dr. Jeff W. Lichtman y su equipo (Walsh & Lichtman, 2003; Bishop et al., 2004; Song et al., 2008). Durante el desarrollo nervioso, numerosas motoneuronas envían sus procesos axónicos que compiten y convergen en una misma NMJ de una fibra muscular. Después, durante las primeras semanas postnatales, todos los procesos excepto uno se debilitan y acaban desapareciendo (Walsh & Lichtman, 2003). Específicamente y de forma secuencial, ocurren los siguientes procesos: primero, se produce una endocitosis masiva generando grandes cisternas membranosas, autofagosomas y cuerpos multivesiculares (MVB) que engloban a las vesículas sinápticas reduciendo su densidad en el terminal presináptico. Este proceso va en paralelo a una desorganización del citoesqueleto, principalmente de neurofilamentos dentro de los terminales presinápticos y en las regiones más proximales del axón. A continuación, hay una reducción del tamaño del terminal presináptico debido a la elevada endocitosis, hasta generar una estructura en forma de bulbo de retracción, desensamblando los terminales pre- y postsinápticos entre sí. Paralelamente, el axón que se mantiene, se extiende y abarca el área postsináptica de contacto que ocupaba el axón retraído (Walsh & Lichtman, 2003). Así, una sinapsis se refuerza mientras otra se elimina (Fig. I26).



**Figura I26. Curso temporal *in vivo* de la eliminación sináptica de uniones neuromusculares poliinervadas de un ratón neonato.** Imágenes de la misma NMJ entre P11 y P15. El axón marcado con CFP (azul) comienza a retraerse (flecha) hasta eliminarse completamente (asterisco) y es relegado por el axón YFP (amarillo) que se extiende y ocupa todo el área de la NMJ. Barra de calibración, 10  $\mu$ M. Modificado de (Walsh & Lichtman, 2003).

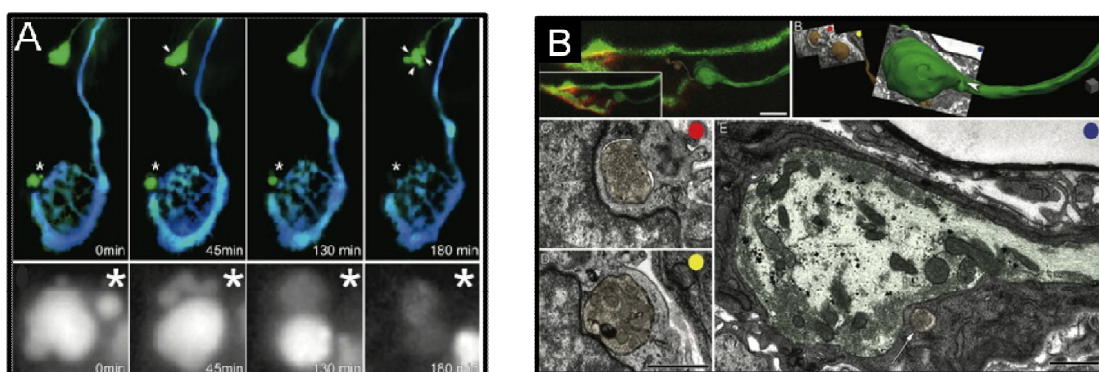


Posteriormente, se inicia la degradación de los cuerpos multivesiculares, mediante el trasiego de lisosomas que viajan hacia el terminal axónico en retracción, y se fusionan a endosomas, MVBs y autofagosomas, hasta acidificar prácticamente todo el bulbo de retracción (Fig. I27, Bishop et al., 2004).



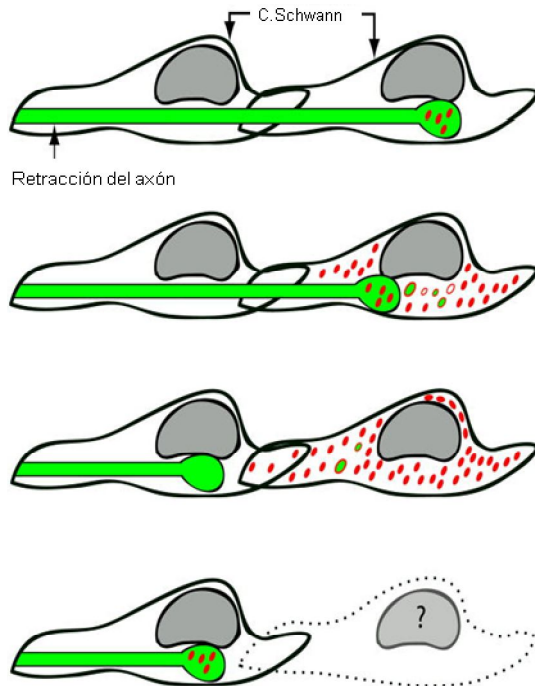
**Figura I27. Actividad lisosomal asociada a la eliminación sináptica.** A) Estructura del bulbo axónico de retracción (imágenes punto rojo), y de axosomas segregados (punto rojo y amarillo). Se observan lisosomas primarios (punto amarillo), lisosomas secundarios (punto rojo y recuadro) y autofagosomas (punto azul) B) Traslado de lisosomas hacia el terminal axónico en retracción. Modificado de (Bishop et al., 2004)

Finalmente, ocurre la liberación al exterior celular de exosomas de 200-900 nm de diámetro, que contienen restos axónicos, como vesículas sinápticas y mitocondrias, favoreciendo la segregación del bulbo y su continua retracción (Fig. I27-28).



**Figura I28. Formación y liberación de exosomas.** A) Retracción axonal (verde) en la NMJ de ratón, permaneciendo otro axón (verde). El terminal axónico retraído se deforma (flechas) segregándose en axosomas (asteriscos). B) Ultraestructura de los exosomas y del bulbo de retracción. En los axosomas se observan vesículas sinápticas, cisternas membranosas, mitocondrias y algún lisosoma. Mientras el bulbo axónico no tiene vesículas, aunque sí estructuras membranosas, lisosomas y alguna mitocondria. Barra de calibración, 5 µm (superior), 1 µm (inferior). Modificado de (Bishop et al., 2004).

Los restos liberados son fagocitados por las células de Schwann perisinápticas (heterofagia), que también aumentan la presencia de lisosomas en su citoplasma celular (Fig. I29). Pero la glía no sólo rodea a los cuerpos exosomales que se van disgregando del bulbo, sino también al bulbo completo (Fig. I29).



**Figura I29. Modelo de la actividad lisosomal en el axón y en la glía durante la eliminación sináptica.** Los autofagosomas y endosomas generados en el axón, se acidifican por la fusión a lisosomas (puntos rojos en axón). La posterior segregación del bulbo en forma de axosomas provoca heterofagia de la glía (puntos rojos en la glía). Esta retracción del bulbo axónico genera la llegada de nuevos lisosomas al terminal que comienzan el siguiente ciclo de digestión y coincide con la célula glial situada más próxima. El destino de la glía que ha hecho heterofagia masiva, no se conoce. (Modificado de (Song et al., 2008).

El modelo de eliminación propuesto por el grupo del Dr. Lichtman en la unión neuromuscular de rata, podría ser equiparable a otras sinapsis colinérgicas como la unión neuromuscular de rana o la sinapsis del ganglio cervical superior. El SCG sufre una reducción de sinapsis axosomáticas y un incremento de los axodendríticas entre las 2 y 3 semanas postnatales (Heath et al., 1992). La cola del renacuajo de *Xenopus* se reabsorbe en el momento de la metamorfosis provocando la eliminación de las NMJs (Brown & Cai, 2007). Si el modelo de Lichtman y colaboradores se puede aplicar a estas dos estructuras colinérgicas es una cuestión abierta, y se investigó en esta tesis.

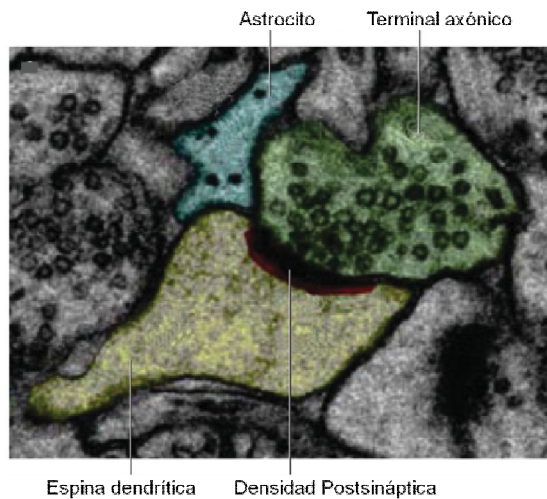
Sin embargo, no sólo se ha descrito una eliminación sináptica durante el desarrollo sino también en la senectud, como se ha observado en ganglios parasimpáticos de ratón de >2 años (Coggan et al., 2004; Baixauli et al., 2014), o en patologías neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington (Funderburk et al., 2010; Ułamek-Kozioł et al., 2013).

En general, la eliminación supone un mecanismo fisiológico importante, que refina el sistema de contactos sinápticos. Pero, ¿cómo se desencadena la eliminación de las sinapsis?. No se conocen las moléculas que la inician. Además, se eliminan unas sinapsis y otras no. Por lo tanto, ¿es un proceso selectivo?, ¿de qué depende?. La glía participa durante la sinaptogénesis liberando factores que favorecen la formación de contactos sinápticos, y regulan la maduración. En este contexto, también sería posible que las células gliales liberaran factores que pudieran desencadenar la eliminación sináptica. Pero, ante la selectividad del proceso ¿cómo sabría la célula glial qué contacto es el que debe ser eliminado?. En esta tesis abordamos parte de estas cuestiones en el entramado de interacciones neurona-glía que aún están sin responder.

#### **4.3. PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS GLIALES EN EL REFINADO SINÁPTICO.**

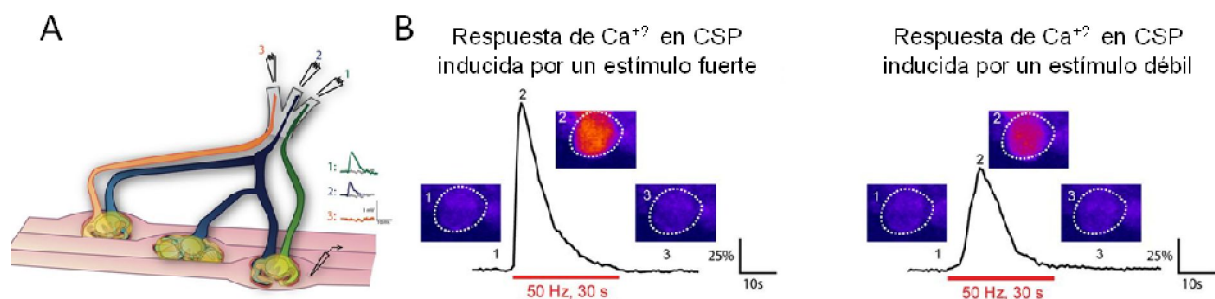
A nivel funcional existen cambios en los contactos sinápticos que van a ser eliminados frente a aquéllos que resisten y maduran. Estudios en las NMJs de ratón poliinervadas, han observado que los contactos que van a ser eliminados generan una respuesta muy débil en la fibra muscular (1 o 2 días antes de la eliminación), mientras que los axones cuyos contactos perduran, registran mayor potencia (Colman et al., 1997). Este mismo fenómeno ocurre en neuronas piramidales de hipocampo, donde los contactos que son eliminados presentan una marcada depresión sináptica previa (Wiegert & Oertner, 2013). Por lo tanto, se puede afirmar que el proceso de eliminación es dependiente de actividad.

Las células gliales se encuentran alrededor de las sinapsis (glía perisináptica, Fig. I30), y liberan factores que son importantes para su conectividad (Eroglu & Barres, 2010). Así, se podría sugerir un papel activo de estas células en el refinado sináptico, maduración y eliminación, a través de dichos factores. En este contexto, las interacciones neurona-glía podrían decidir el destino de las sinapsis. Pero, ¿cómo sabe la glía perisináptica cuándo tiene que liberar los factores? Numerosos estudios le han atribuido propiedades importantes a las células gliales en su relación con las neuronas:



**Figura I30. Sinapsis tripartita en hipocampo.** Según este modelo el proceso astrocitario (azul) envuelve el área perisináptica para modular activamente la neurotransmisión entre el terminal axónico de la neurona (verde) con la espina dendrítica (amarillo). (Modificado de (Eroglu & Barres, 2010)

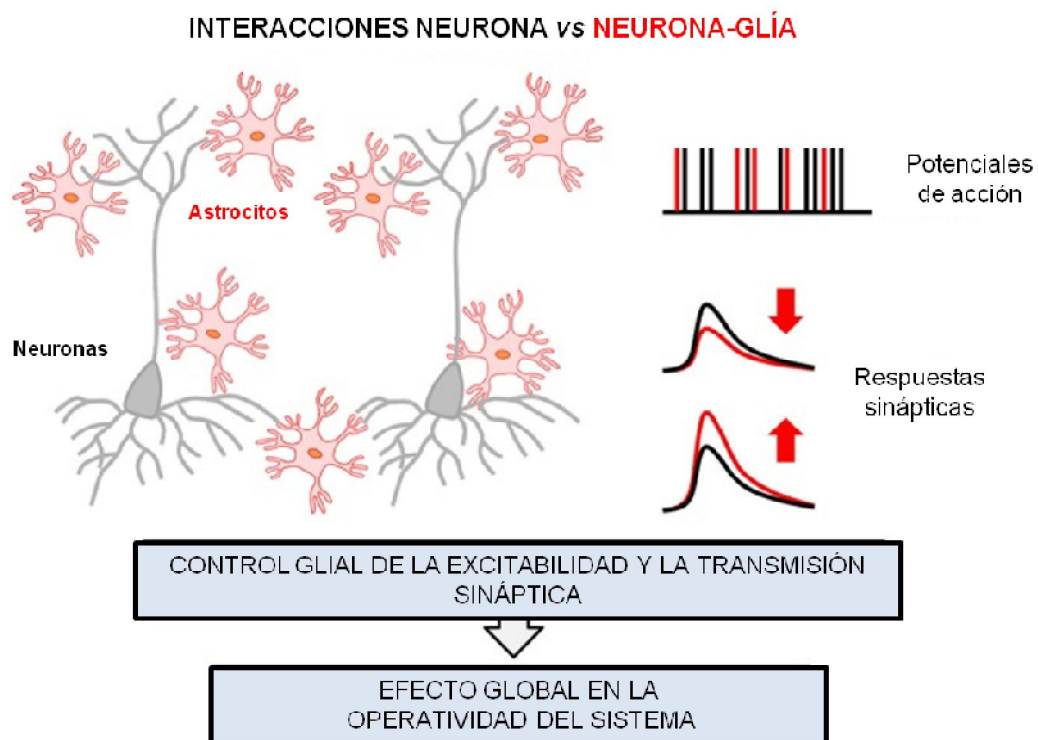
Las células gliales actúan como sensor de la actividad de las sinapsis que contactan aumentando sus niveles de calcio intracelular. Por ejemplo, una célula de Schwann perisináptica es capaz de discernir entre el contacto sináptico más fuerte y el más débil en una poliinervación de una misma NMJ (Fig. I31, Darabid et al., 2013). La activación de la célula de Schwann es debido a la liberación de ATP desde la neurona, y no al neurotransmisor, que activa los receptores purinérgicos P2 $\gamma$  gliales yuxtapuestos al terminal presináptico.



**Figura I31. Respuesta selectiva de la glía perisináptica ante un estímulo fuerte y uno débil.** A) Registro de la respuesta evocada mediante un electrodo en la fibra muscular cerca de una unión neuromuscular doblemente inervada. La estimulación de diferentes axones generó diferentes respuestas postsinápticas. B) Cambios en el calcio intracelular de un célula de Schwann perisináptica (CSP), por la estimulación de sendos axones que innervan una misma unión neuromuscular. Obsérvese diferencia en función de la fuerza sináptica. Modificado de (Darabid et al., 2013).

Además de actuar como sensores, se ha descrito que tras ser activadas, las células gliales son capaces de modular la excitabilidad y la respuesta sináptica, mediante la liberación de gliotransmisores, de forma paralela al neurotransmisor del terminal presináptico. Este fenómeno es la base del concepto de sinapsis tripartita (Perea & Araque, 2007; Perea, Navarrete, & Araque, 2009). Los estudios del Dr.

Alfonso Araque, Philip Haydon y colaboradores describen en hipocampo que la liberación de glutamato como gliotransmisor activa los receptores metabotrópicos presinápticos, coincidente en el tiempo con la respuesta postsináptica. El gliotransmisor altera la plasticidad incrementando la probabilidad de liberación (Perea & Araque, 2007). Otros estudios optogenéticos recientes en la corteza visual de ratones, demuestran que la activación mediante pulsos de luz azul, de los astrocitos que expresan el canal de rodopsina tipo 2 (ChR2), potencia tanto la transmisión sináptica excitadora como la inhibitoria, también a través de receptores metabotrópicos (Perea et al., 2014). Ambos resultados indican que la glía está directamente involucrada en la transferencia y almacenamiento de la información sináptica (Fig. I32).



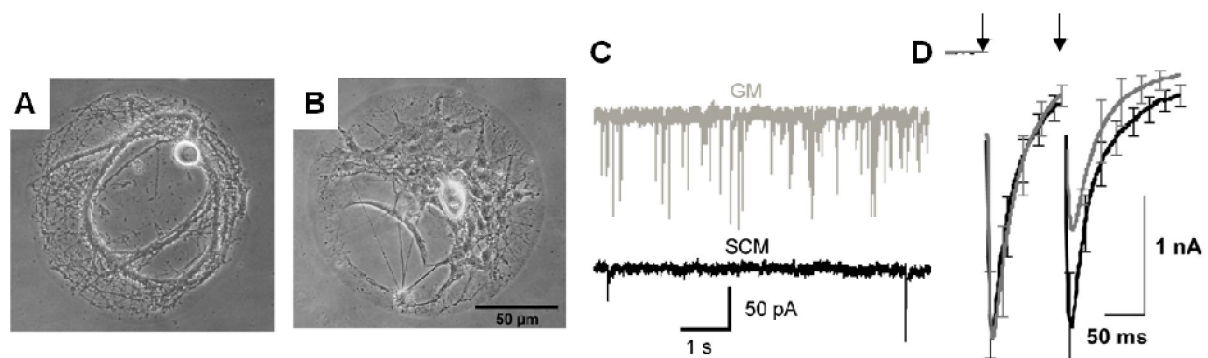
**Figura I32. Las interacciones neurona-glía modifican activamente la transmisión y la plasticidad sináptica.** Los astrocitos interactúan con las neuronas y alteran su excitabilidad y su respuesta sináptica, influyendo en las características importantes del procesamiento de la información a nivel local, y por tanto, en la operatividad de todo el entramado neural (Perea, et al., 2014).

Además, las células gliales liberan factores constitutivamente durante el desarrollo, que participan en la sinaptogénesis y en el mantenimiento o modificación de las propiedades sinápticas (Ullian, et al., 2004). Algunos de estos factores y sus efectos se resumen en la tabla I5.

Factor secretado por la glía	Función en el sistema nervioso	Referencia
TGFβ1 ( <i>transforming growth factor</i> )	- Formación de sinapsis en la NMJ - Síntesis de otras proteínas sinaptogénicas como agrina	(Feng & Ko, 2008)
TSP 1 (trombospondina)	- Acelera la sinaptogénesis en neuronas inmaduras en el hipocampo y en neuronas ganglionares de retina - Forma sinapsis silentes	(Xu, Xiao, & Xia, 2010)
Colesterol	- Diferenciación de las dendritas - Eficacia en la liberación del neurotransmisor	(Goritz, et al., 2005)
Hevin	- Sinaptogénesis	(Kucukdereli et al., 2011)
SPARC ( <i>Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein</i> )	- Antagoniza la acción de hevin - ¿Algún otro efecto en el sistema nervioso?	

**Tabla I5. Algunos factores liberados por la glía de forma constitutiva durante el desarrollo nervioso.**

Trabajos previos en nuestro laboratorio habían determinado diferencias funcionales en microcultivos de neuronas del SCG de rata en presencia y en ausencia de glía (Perez-Gonzalez, et al., 2008). En presencia de glía, las sinapsis quedaban retenidas en un estado de inmadurez, presentando un incremento de neurotransmisión espontánea, una alta probabilidad de liberación y una marcada depresión a corto plazo (Andreae et al., 2012; Feldmeyer & Radnikow, 2009). Todo lo contrario a lo encontrado en ausencia de glía, a los mismos días *in vitro* (Fig. I33).



**Figura I33. Efecto de las células de Schwann en neuronas autápticas del ganglio cervical superior.** A) Neurona autáptica en ausencia de glía, *SCM* (*single-cell microculture*). B) Neurona autáptica en presencia de glía, *GM* (*glial microculture*). C) Neurotransmisión espontánea, *mEPSCs*, registrada en *GM* (en gris,  $\sim 1.5$  *mEPSC/s*) y *SCM* (en negro,  $\sim 0.2$  *mEPSC/s*) a 2 mM  $\text{Ca}^{+2}$ . Obsérvese el aumento en presencia de glía. C) Neurotransmisión evocada promedio, *EPSCs*, frente a pulsos pareados (flechas) con un intervalo de tiempo de 100 ms, a 2 mM  $\text{Ca}^{+2}$  comparando *SCM* (negro) y *GM* (gris). Obsérvese la depresión en presencia de glía. Modificado de (Perez-Gonzalez et al., 2008).

Un análisis más minucioso determinó que el principal responsable de este efecto era la proteína *Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein* (SPARC). Se trata

de una proteína matricelular liberada por las células gliales de forma constitutiva que juega un rol poco conocido en el refinamiento sináptico, pero que parece antagonizar el efecto de la proteína sinaptogénica hevin (Kucukdereli et al., 2011).

Este motivo nos llevó a caracterizar el efecto de SPARC sobre la neurotransmisión.

#### **4.4. SPARC, Y SU EFECTO SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN CONOCIDO HASTA EL MOMENTO.**

##### **4.4.1. Naturaleza de la proteína SPARC.**

SPARC, es una proteína con peso molecular de 35 KDa y punto isoeléctrico de 4.87. Pertenece a las denominadas proteínas matricelulares que se caracterizan por encontrarse en la matriz extracelular pero que no contribuyen directamente a la formación de elementos estructurales de la matriz. Su función es modular las funciones celulares y la interacción entre la célula y la matriz extracelular, uniéndose a receptores de la superficie de la célula por un lado, y colágeno y membranas basales por otro (Bornstein, 1995; Bornstein & Sage, 2002). Además, es susceptible de ser cortada por metaloproteasas liberadas a la matriz extracelular. El principal trío de proteínas matricelulares de relevancia sináptica son: SPARC (también conocida como osteonectina y BM-40), trombospondina (TSP-1) y tenascina (Tenascina-C, TN-C). Aunque no están relacionadas en la estructura primaria, las características principales que las definen son: *i*) son secretadas por diversos tipos de células; *ii*) asociadas con la matriz extracelular insoluble y fibrilar, pero no necesariamente parte de ella; *iii*) son antiadhesivas para las células bajo diversas condiciones; *iv*) prevalecen en áreas de tejido durante su remodelación asociada con procesos normales o patológicos; *v*) destacadas en la embriogénesis de mamíferos y aves (Murphy-Ullrich & Sage, 2014). Otras proteínas matricelulares con efectos sinápticos son hevin/SC-, de la familia de SPARC, y TSP-2, de la familia de trombospondina.

##### **4.4.2. Expresión, localización y acción conocida de SPARC.**

SPARC se considera como una proteína de adhesión intermedia (Murphy-Ullrich, 2001). Se cree que se une a receptores beta-integrina tipo 1, y señala a través de la quinasa unida a integrina, GSK-3beta. El efecto es la modificación de la forma celular, la adhesión y la diferenciación (Nie & Sage, 2009). Además SPARC aparece incrementada tanto en cultivo como *in vivo* tras el daño y remodelado del

tejido. También aumenta en cáncer, donde, debido a estas propiedades antiadhesivas, se sugiere su posible implicación en procesos metastásicos (Tai & Tang, 2008).

En el sistema nervioso, SPARC es secretada por las células gliales: astrocitos, microglía, la glía radial, la glía de Bergmann en el cerebelo y las células de Müller en la retina. Durante el desarrollo se distribuye por todo el sistema nervioso, particularmente en las áreas sinaptogénicas y en desarrollo, y en torno a las sinapsis en el hipocampo (Mendis & Brown, 1994; Mendis, Malaval, & Brown, 1995; Mendis, Shahin, Gurd, & Brown, 1994). También se expresa en ratones adultos y tras un daño en el sistema nervioso (Liu et al., 2005; Mendis, Ivy, & Brown, 1998; Vincent, Lau, & Roskams, 2008). En hipocampo, Jones y colaboradores observaron que SPARC tenía su máxima expresión alrededor del día P14, disminuyendo posteriormente, coincidente con el período de máxima formación, eliminación y reorganización de las sinapsis en esta estructura (Jones et al., 2011). A nivel funcional, las neuronas de hipocampo cultivadas con astrocitos de ratones *knock-out* de SPARC, incrementaban los niveles de receptores AMPA, volviendo a niveles control cuando las neuronas eran tratadas durante 48 horas con SPARC recombinante. Además, las neuronas de los ratones *knock-out* de SPARC no sufrían un refinado en el número de sinapsis durante el desarrollo (Jones et al., 2011).

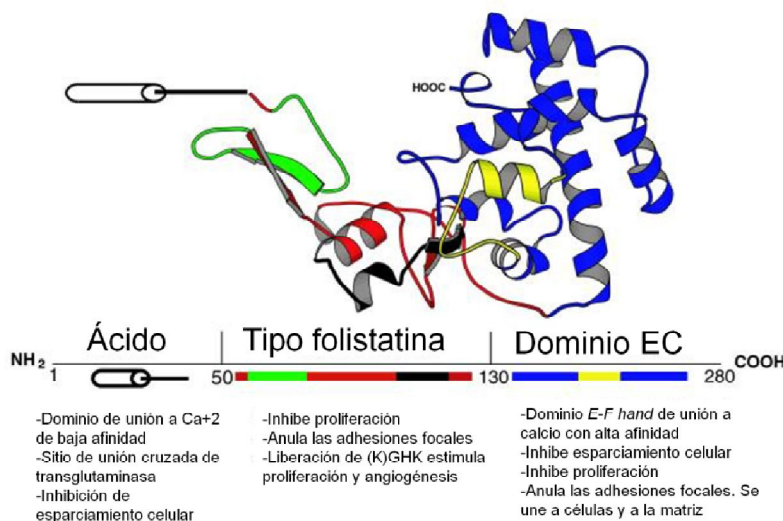
SPARC es una proteína muy conservada en vertebrados. Está codificada por un único gen que tiene un alto grado de conservación evolutivo. El gen humano es un 92% y un 32% idéntico a los homólogos de ratón y nematodos respectivamente (Brekken & Sage, 2001). En *Xenopus laevis*, SPARC se expresa en la notocorda y en las somitas durante la embriogénesis, disminuyendo progresivamente durante el desarrollo. A nivel de las NMJs de *Xenopus*, la expresión de SPARC también varía. Los niveles son elevados cuando los músculos aún no están inervados y disminuyen drásticamente cuando se forman las sinapsis (Damjanovski et al., 1994). Esto sugiere que la ausencia de SPARC es necesaria para la formación de los contactos sinápticos.

#### **4.4.3. Estructura de SPARC.**

. En vertebrados, el gen codifica para una proteína de 198-304 aminoácidos, en donde los primeros 17 aminoácidos constituyen el péptido señal.

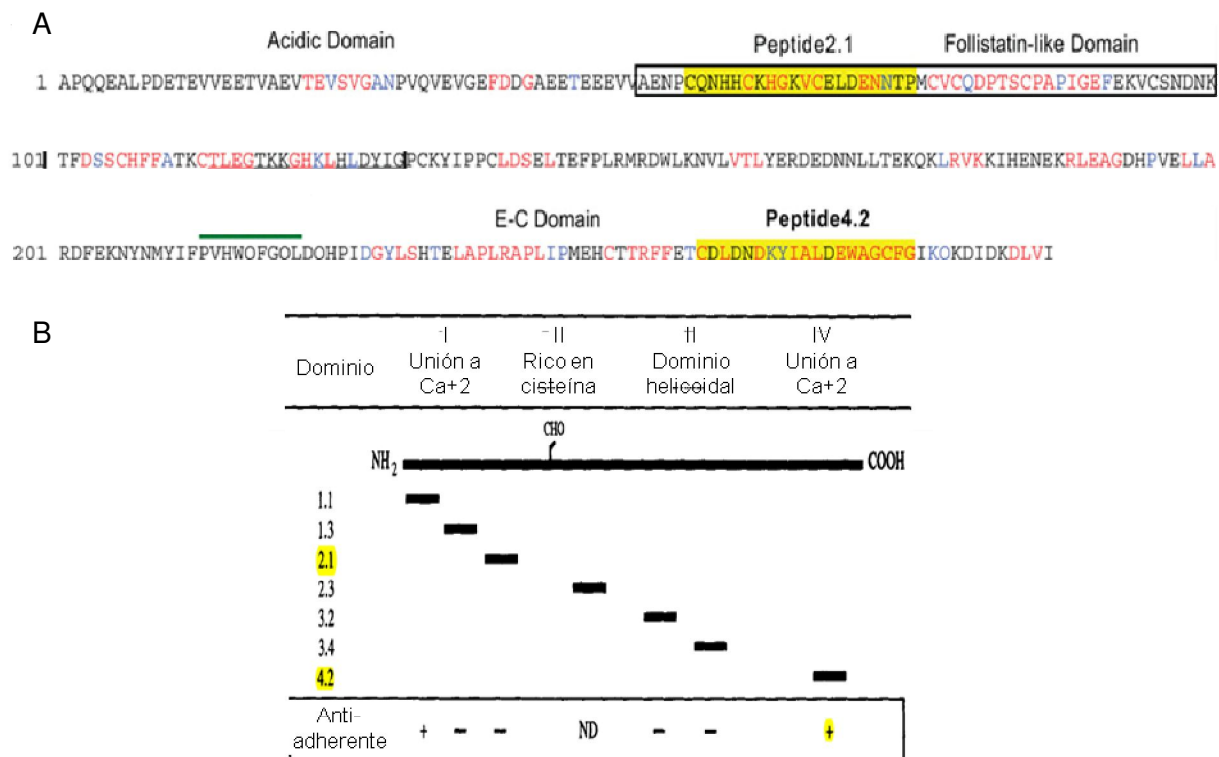


SPARC está formada por tres dominios diferentes (Fig. I34): *i*) Dominio ácido (aa 3-51), se une calcio con una constante de afinidad de  $10^{-3}$ - $10^{-5}$  M. *ii*) Dominio tipo folistatina (FL, aa 52-132), posee 10 cisteínas, similar a TGF $\beta$  y a agrina. Este dominio contiene secuencias de aminoácidos que podrían ser cortadas por metaloproteasas liberadas de la matriz y generar péptidos bioactivos como el péptido 2.1 que inhibe la proliferación de las células endoteliales (Funk & Sage, 1993). El dominio folistatina contiene una secuencia KHGKVC que une cobre y que está altamente conservada en todas las proteínas SPARC en vertebrados, sugiriendo que podría ser el dominio regulador de la proteína. *iii*) Dominio EC (*extracellular matrix calcium-binding domain*, aa 133-285), une calcio con alta afinidad y se une a la matriz extracelular. Este dominio también es cortado por metaloproteasas. Algunos péptidos derivados de este dominio, como el péptido 4.2, se unen a las células endoteliales inhibiendo su proliferación (Bradshaw, Graves, et al., 2003; Kupprion, Motamed, & Sage, 1998). A su vez, el módulo EC se une a colágenos tipo I-V en una forma dependiente de calcio (Sasaki et al., 1997; Sasaki, Hohenester, Göhring, & Timpl, 1998).



**Figura I34. Estructura de SPARC humana.** A partir de estudios de cristalografía, se pueden observar los diferentes módulos estudiados de SPARC. El dominio FL se muestra en rojo, excepto para los péptidos 2.1 (aa 55-74) y para el péptido 2.3 (aa 113-130), que se muestran en verde y negro respectivamente. El dominio EC se muestra en azul, excepto para el péptido 4.2 (aa 254-276), que se muestra en amarillo. Modificado de (Bradshaw & Sage, 2001).

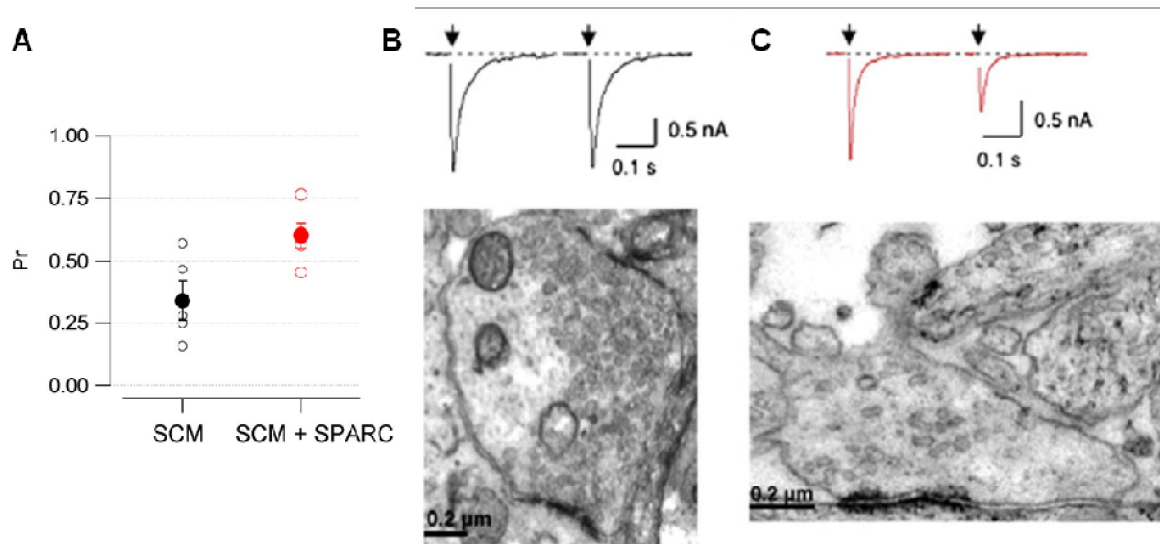
Por lo tanto, el corte de SPARC de forma fisiológica por metaloproteasas de la matriz extracelular, genera fragmentos que podrían revelar nuevas funciones para la proteína (Dziadek et al., 1986; Sage et al., 2003). Con la finalidad de reproducir funciones específicas de la proteína, se pueden sintetizar numerosos péptidos bioactivos (Fig. I35). Los péptidos que han mostrado una mayor actividad son el p2.1 (aa 55-74) y el p4.2 (aa 254-276).



**Figura I35. Péptidos bioactivos de SPARC.** A) Secuencia de SPARC humana. Están resaltados en amarillo los dominios que previamente han sido catalogados como péptidos bioactivos obtenidos tras el corte de ciertas proteasas de la matriz extracelular. B) Péptidos bioactivos sintetizados a partir de diferentes secuencias de SPARC de ratón y su capacidad antiadhesiva en fibroblastos. A modificada de (Nie & Sage, 2009); B de (Lane et al., 1994).

#### 4.4.4. Indicios del efecto de SPARC sobre la neurotransmisión.

Antes de mi llegada al laboratorio, se trató de caracterizar la proteína SPARC sobre neuronas. Puesto que había sido encontrada en una concentración siempre superior a 1 nM en los medios condicionados de las células de Schwann, se comenzó por aplicar la proteína recombinante de ratón a dos concentraciones diferentes: 10 ng/mL (~0.25 nM) y 100 ng/mL (~2.5 nM). Mientras que a concentraciones subnanomolares la proteína no modificó las características funcionales de los SCMs, a concentraciones nanomolares SPARC arrestó a los terminales presinápticos en un fenotipo inmaduro (Albrecht et al., 2012). Presentaba como características: un aumento de la actividad espontánea, un incremento de la depresión a corto plazo, un incremento de la probabilidad de liberación y unos depósitos de liberación presinápticos con un número reducido de vesículas (Fig. I36).



**Figura I36. SPARC a bajas concentraciones arresta a los terminales presinápticos colinérgicos en un estado de inmadurez.** A) Las sinapsis tratadas crónicamente con 2.5 nM de SPARC, presentan una elevada probabilidad de liberación cuando son registradas a 2 mM  $[Ca^{+2}]_{ext}$ , comparadas con las células control. B) Estudio correlativo de una neurona autáptica colinérgica control que no presenta depresión a corto plazo y dispone de terminales presinápticos con una elevada densidad de vesículas citoplasmáticas y vesículas adosadas a la zona activa. C) Estudio correlativo de una neurona autáptica colinérgica tratada crónicamente con 2.5 nM de SPARC, que presenta una reducida densidad de vesículas citoplasmáticas y un reducido número de vesículas adosadas a la zona activa. Modificado de (Albrecht et al., 2012).

Estos resultados demuestran que, SPARC afecta a los depósitos de las vesículas y a la plasticidad presináptica. A partir de aquí se decidió estudiar más profundamente el efecto inhibitorio que SPARC ejercía sobre la neurotransmisión. Para ello eran necesarios nuevos experimentos, como establecer la dosis-dependencia, usar fármacos que puedan inhibir el efecto de SPARC ó poner a punto nuevas herramientas (CHC-RNAi) para controlar la dinámica de las vesículas.

# OBJETIVOS

*"El mundo entero se aparta cuando ve pasar a un  
hombre que sabe a dónde va"*

Antoine de Saint-Exupéry



El objetivo principal de esta tesis fue profundizar en dos de los mecanismos que afectan a la plasticidad sináptica a corto término: el grado de madurez de las sinapsis y el balance entre exocitosis y endocitosis.

Mediante el uso de dos modelos de sinapsis colinérgicas establecidos en nuestro laboratorio: cultivos autápticos colinérgicos de neuronas del ganglio cervical superior y, la unión neuromuscular de la cola del renacuajo de *Xenopus tropicalis*, en esta tesis doctoral se plantean los siguientes objetivos:

1. Caracterización *in vitro* de los cambios funcionales asociados a la maduración de los terminales presinápticos.
2. Estudio del papel de los niveles sinápticos de clatrina en la neurotransmisión.
3. Efectos de la proteína SPARC sobre la maduración sináptica.



# MATERIALES Y MÉTODOS

*"El cuerpo humano es el carruaje; el yo, el hombre que lo conduce; el pensamiento son las riendas, y los sentimientos los caballos"*

Platón





## 1. CULTIVOS CELULARES.

Para abordar los objetivos de esta tesis, se emplearon dos tipos de cultivos celulares. Principalmente fueron usados cultivos primarios de neuronas del ganglio cervical superior de rata establecidos en forma de microcultivos. Para la producción de lentivirus como herramientas de infección y modificación genética de las neuronas se usó la línea celular HEK-293T.

### 1.1. CULTIVOS PRIMARIOS. MICROCULTIVOS DE NEURONAS.

Los microcultivos de neuronas son un gran modelo para el estudio de las funciones sinápticas y de plasticidad, ya que una célula individual, *Single-Cell Microculture* (SCM), establece contactos sinápticos con ella misma, y por lo tanto presenta, a la vez, el componente presináptico y postsináptico. A este tipo de *SCMs* de neuronas se les conoce, también, con el nombre de cultivos autápticos.

La gran ventaja de este sistema es que evita la interferencia de otras neuronas en el circuito sináptico, facilitando la interpretación de los resultados obtenidos. Esto permite que los registros electrofisiológicos se lleven a cabo con un sólo electrodo, que es capaz de estimular y registrar las respuesta fisiológicas (Perez-Gonzalez, Albrecht et al. 2008). Los cultivos se establecen a partir de neuronas del ganglio cervical superior (*SCG, Superior Cervical Ganglion*), que a diferencia de las neuronas del sistema nervioso central, requieren únicamente del factor trófico *nerve growth factor, NGF*, para poder crecer sin células gliales.

La ausencia de glía hace de los SCMs una herramienta única para separar el posible efecto que las células no neurales pudieran ejercer sobre la respuesta sináptica. Por tanto, facilita el estudio de la interacción neurona-glía y de la acción de los factores secretados por las células gliales sobre la neurotransmisión (Albrecht, López-Murcia et al. 2012).

Las neuronas se obtienen del SCG de ratas albinas *Sprague-Dawley* entre los días 0-3 postparto (P0-P3). El procedimiento ha sido aprobado por el Comité Ético de la Generalitat de Catalunya (DMAH #5131).

#### 1.1.1. Material.

Material quirúrgico (Fig. M1):

- Pinzas “Dumont Tweezers #55” (ref: 14099, World Precision Instruments Ltd, UK)

- Tijeras “Superfine Vannas” punta recta 8 cm de largo (ref: 501778 World Precision Instruments Ltd, UK)
- Tijeras “McPherson-Vannas” punta curva 12 cm de largo (ref: 503364501778 World Precision Instruments Ltd, UK)



**Figura M1. Material quirúrgico para la disección**

- A) Pinzas “Dumont Tweezers #55”  
 B) Tijeras Superfine Vannas punta recta 8 cm de largo  
 C) Tijeras McPherson-Vannas punta curva 12 cm de largo

### Cubreobjetos:

Para el establecimiento de los microcultivos, se utilizan dos tipos de cubreobjetos en función de la finalidad del estudio:

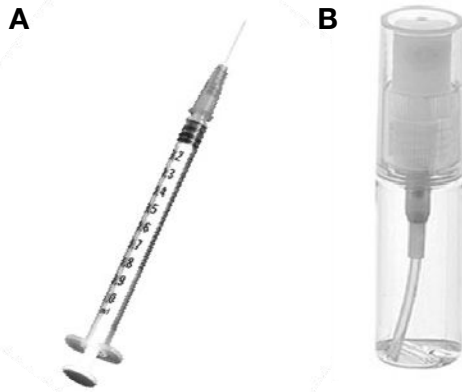
a) Cubreobjetos de vidrio de 15 mm de diámetro (Thermo Scientific, Alemania) previamente esterilizados por sonicación en etanol al 70 % (v/v), y expuestos 1 h a radiación UV. Se usan para microcultivos destinados a registros electrofisiológicos y experimentos correlativos de electrofisiología e inmunofluorescencia.

b) Cubreobjetos de plástico termo-resistente (thermanox) de 15 mm de diámetro (Thermo Scientific, ref: 174969) previamente esterilizados en etanol al 70 % (v/v) y 1 h de radiación UV. Se usan para microcultivos destinados a experimentos correlativos de electrofisiología y microscopía electrónica.

### Material de cultivo (Fig. M2):

Material	Casa Comercial	Referencia
Cubreobjetos 15 mm diámetro	Thermo Scientific, Alemania	
2 Placas para cultivo celular de 12 pocillos estéril	TPP, Suiza	92012
3 Placas de Petri no estériles de 5.5 cm de diámetro		
Placa de Petri estéril de 10 cm de diámetro	TPP, Suiza	93100
Pipetas Pasteur de vidrio esterilizadas modificadas		
Jeringa de tres cuerpos estéril de 1 mL con aguja	Rubilabor, España	141.2001A
Cámara de Neubauer		
Frasco atomizador 12 ml	Tiendas Muji, <a href="http://www.muji.es">www.muji.es</a>	4945247030495
Tubo de centrifuga de 15 ml		
Tubo <i>Eppendorf</i> de 1.5 ml		

**Tabla M1. Material utilizado en el cultivo primario de neuronas**



**Figura M2. Jeringa de tres cuerpos y frasco atomizador.** A) Jeringa de tres cuerpos, empleada en la disgregación final y resuspensión de las neuronas, previo al sembrado en la placa de cultivo. B) Frasco atomizador de 12 ml utilizado para el depositado de microgotas del sustrato colágeno sobre el cubreobjetos donde se hace el sembrado de las neuronas.

### Soluciones:

- Solución de agarosa al 0.15 % (p/v) (ver Anexo soluciones)
- Tampón fostato salino (PBS) estéril (ver Anexo soluciones)
- Solución de colágeno (ver anexo I de materiales y métodos)
- Agua bi-distilada estéril
- Etanol 70 % (v/v)
- Colagenasa IA 2.5 mg/mL en PBS estéril
- Tripsina-EDTA 0.05 % (Gibco®, ref: 25300-62)

Medio de cultivo pre-incubación	Medio de cultivo neuronal
<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM:F12 (1:1), con Glutamina y sin HEPES (Gibco®, ref: 11320-033)</li> <li>• 20 % (v/v) Suero bovino fetal, FBS (Invitrogen)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM:F12 (1:1), con Glutamina y sin HEPES (Gibco®, ref: 11320-033)</li> <li>• 2.5 % (v/v) FBS (Invitrogen)</li> <li>• 2.5 % (v/v) Suero de Rata (RS)*</li> <li>• 0.5 <math>\mu</math>M NGF-7S (Alomone Labs, Israel)**</li> <li>• 2 nM CNTF (Alomone Labs, Israel)**, adicionados a partir del segundo cambio de medio.</li> <li>• 0.25 % (v/v) Penicilina-Estreptomicina (P/E) *** (ref: P0781, Sigma-Aldrich). La solución comercial con 0.9 % NaCl, cada mL de solución contiene 10000 unidades Penicilina / 10 mg Estreptomicina</li> </ul>

**Tabla M2. Medios de cultivo de los SCMs**

\* RS facilitado por el estabulario del Campus de Medicina de Bellvitge, Universitat de Barcelona

\*\* Los factores tróficos NGF y CNTF se añaden al medio inmediatamente antes del sembrado de las neuronas en la placa o antes del cambio de medio correspondiente.

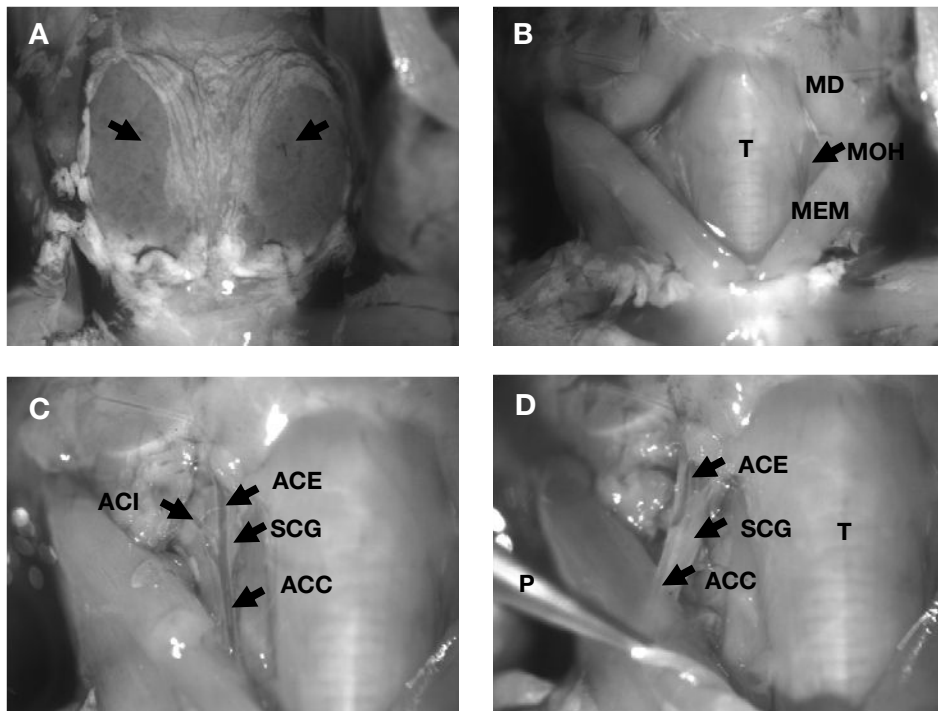
\*\*\* La dosis de 0.25 % (v/v) P/E es para momento de la siembra de las neuronas en la placa de cultivo. A partir del primer cambio de medio se aumenta la dosis a 0.5 % (v/v).

### 1.1.2. Procedimiento.

El primer paso para la realización del cultivo primario de las neuronas en forma de microcultivos, es el tratamiento de los cubreobjetos de 15 mm de diámetro, previamente esterilizados, que son colocados en placas de cultivo celular de 12 pocillos. Una vez en los pocillos de las placas, los cubreobjetos son tratados con un sustrato no permisivo para el cultivo de neuronas, una solución de agarosa al 0.15 % en agua bi-distilada estéril (Bekkers and Stevens 1991). Al final del procedimiento, se rocían las placas con una solución de colágeno. Sólo aquellas neuronas que se posen sobre las microgotas de colágeno se desarrollarán

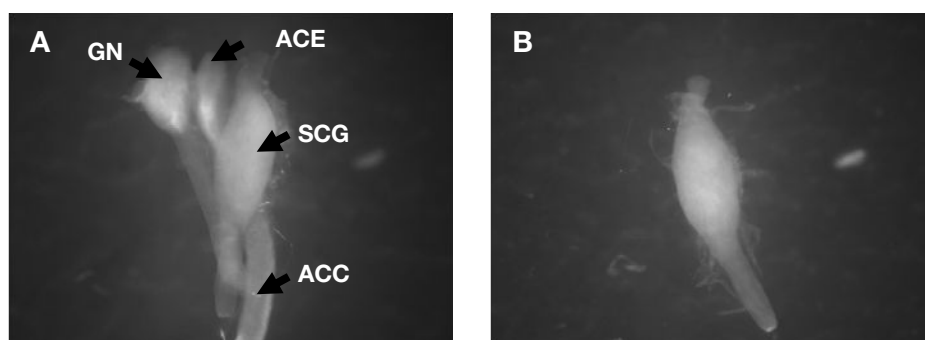
Previamente a la extracción de SCGs de rata, todo el material de disección es esterilizado con luz UV. Las crías de rata son anestesiadas en hielo durante 15 minutos.

Bajo una lupa (*Leica M50*) a 2.5 x de aumento, se realiza una incisión con las tijeras de punta curva, por la parte ventral del cuello de la cría de rata. Tras la extirpación de las glándulas salivares, la tráquea queda visible. Se separa el tejido linfático y glandular y se accede al tejido vasculonervioso profundo del cuello. Entre las diferentes estructuras se observa la arteria carótida común que se bifurca en la arteria carótida interna y externa, en forma de "Y". Con las pinzas *Dumont Tweezers #55*, se eleva la parte inferior de la arteria y queda expuesto el ganglio cervical superior, SCG, además de otras estructuras y tejidos. Se continúa elevando la arteria carótida con las pinzas y con las tijeras *McPherson-Vannas*, de punta recta, se corta la parte más superior posible de las bifurcaciones carotideas externa e interna, y por último un corte por la parte más inferior posible de la arteria carótida común (Fig. M3). La estructura diseccionada contiene en su parte más dorsal el SCG. El tejido se coloca en una placa de Petri de 5,5 cm con PBS 1x estéril a 4° C (Fig. M4A). Este procedimiento es bilateral en cada animal y se extraen los ganglios de 10-12 crías.



**Figura M3. Diseción y extracción del SCG de la cría de rata.** A) Vista de las glándulas salivares (flechas) tras el corte de la piel por la parte ventral del cuello. B) Vista de la Tráquea (T) y los músculos bilaterales esternomastoideo (MEM), digástrico (MD) y omohioideo (MOH). C) Vista de la arteria carótida común (ACC) y su bifurcación carótida externa (ACE) e interna (ACI); además del ganglio cervical superior (SCG) por la parte dorsal de la arteria. D) Vista del SCG levantando con unas pinzas (P) la arteria carótida común (ACC).

Al finalizar todas las extracciones, el SCG se separa de la arteria carótida y del ganglio nodoso y además se retira el recubrimiento de tejido conectivo del SCG, para reducir la presencia de fibroblastos en el cultivo. Los SCG limpios se colocan en una placa de Petri de 5.5 cm de diámetro que contiene PBS 1x estéril (Fig. M4).



**Figura M4. Estructura del SCG.** A) Vista dorsal de la estructura resultante tras el corte de la carótida en los extremos de la ACE, ACI y la ACC. En la parte dorsal de la bifurcación de la arteria carótida encontramos el SCG. El ganglio nodoso (GN) se encuentra junto a la arteria carótida exterior. B) Imagen del SCG extraído y limpio para continuar con la disgregación mecánica y extracción de las neuronas.

Una vez se ha hecho la extracción fina de todos los SCG, nos desplazamos a una campana de flujo laminar vertical, específica para cultivos primarios, donde los colocamos en un tubo *ependorf* de 1.5 mL con 1 mL de solución 2.5 mg/mL de

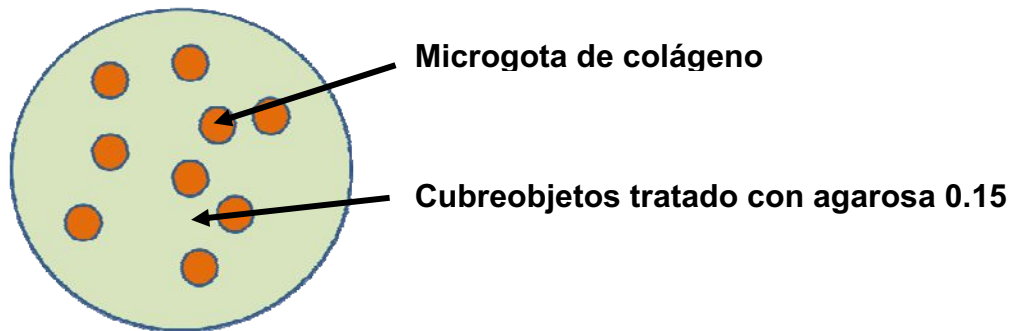
colagenasa tipo IA en PBS 1x estéril, a 37° C durante 10 minutos. Posteriormente, se elimina la colagenasa, quedando los SCG en el fondo del eppendorf, y se adiciona 1 mL de solución de 0.05 % Tripsina-EDTA (Gibco®, ref: 252300-62). Se mantienen 20 minutos en presencia de esta solución a 37°C. Transcurrido este tiempo se retira dicha solución y se adiciona 1 mL del medio de pre-incubación para inactivar la actividad enzimática remanente. Posteriormente los SCG se traspasan a un tubo de centrifuga estéril de 15 mL y se disgregan mecánicamente con el uso de las pipetas *Pasteur*, las cuales han sido modificadas previamente reduciendo su diámetro mediante un mechero *Bunsen*.

Tras la disgregación de los ganglios y la disociación de las neuronas, éstas se traspasan a una placa de Petri para cultivo celular de 10 cm de diámetro que contiene 10 mL de medio de pre-incubación. La placa con las neuronas se coloca en un incubador a 37° C y 8 % CO<sub>2</sub> durante 60-90 min. De esta forma las células neuronales se posan en el fondo de la placa más rápidamente, y las neuronas quedan en flotación por más tiempo. A mayor tiempo de pre-incubación, habrá menor número de células gliales en el cultivo resultante; esto es, a 90 minutos de pre-incubación el cultivo final cuenta con una presencia de células gliales prácticamente nula.

Transcurrido este periodo intermedio, se recoge el sobrenadante de la placa de Petri, y se coloca en un tubo de centrifugación de 15 mL. Se centrifuga durante 2 minutos a 2000g a temperatura ambiente. A continuación, se retira el medio sobrenadante y el precipitado celular se resuspende con 1 mL de medio de cultivo con las pipetas *Pasteur* modificadas y se transfiere todo el volumen a un tubo *eppendorf* de 1.5 mL. Se recuenta el número total de neuronas con una cámara de Neubauer. El medio que contiene las células en suspensión se hace pasar tres veces por una jeringa estéril de 1 mL y las neuronas se resuspenden en el medio de cultivo a una concentración final de 2000-2500 neuronas/mL de medio de cultivo.

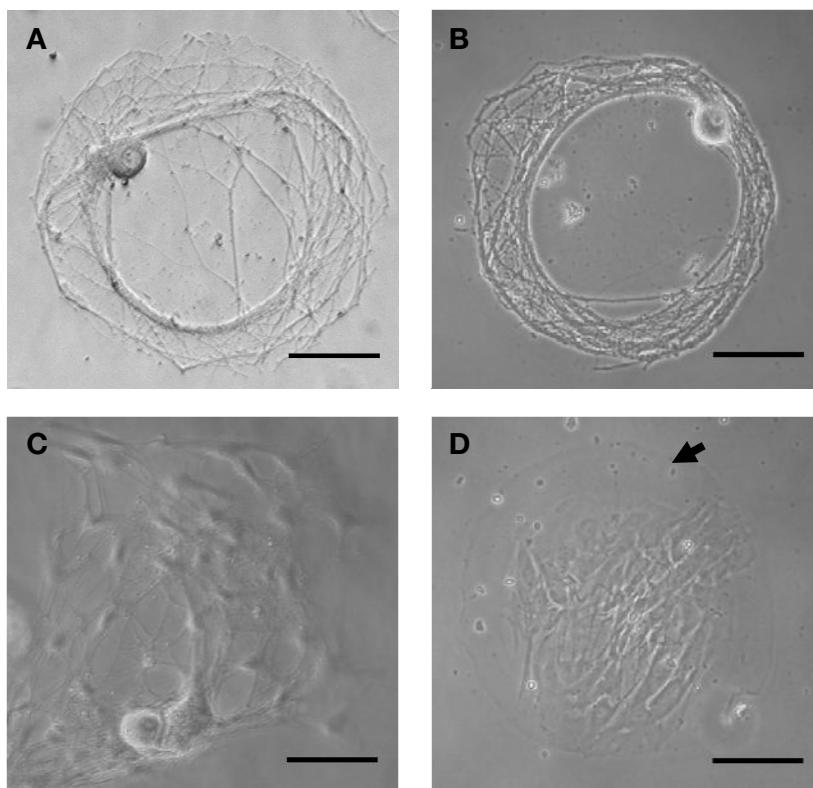
Finalmente, en el frasco atomizador, se realiza la mezcla de colágeno y el medio de cultivo RPMI 10x (ver Anexo I) y se rocía sobre los cubreobjetos pre-tratados con la solución de agarosa al 0.15 % en agua bi-destilada estéril, generando una densidad media de gotas de la mezcla sobre los cubreobjetos que están en las placas de 12 pocillos. Para obtener unas gotas de colágeno adecuadas en tamaño y densidad, se debe pulverizar la mezcla a una distancia de unos 30-45 cm de la placa de cultivo y se debe colocar el frasco atomizador unos 5 cm más alto

respecto a la placa. El colágeno mezclado se rocía en uno o dos pulsos, evitando una pulverización excesiva (Fig. M5).



**Figura M5. Sustratos del microcultivo de neuronas**

Se dejan reposar las microgotas durante 1-2 minutos y antes de que las gotas de colágeno adquieran una tonalidad blanca por completo, que es indicativo de que el colágeno se ha secado, se añade a cada pocillo 1 mL de medio de cultivo con las neuronas en suspensión. Este paso es importante porque las gotas de colágeno se deforman cuando éste se seca, pero tampoco se pueden añadir las células antes de un minuto porque la gota se puede despegar de la superficie del cubreobjetos.



**Figura M6. Imágenes de contraste de fase de diferentes tipos de microcultivos.** A) y B) Microcultivos de una única neurona en la gota de colágeno (SCM o autóptica). C) Microcultivo donde una neurona se desarrolla junto a otras células no neuronales en la misma gota de colágeno (GM). D) Microcultivo de células no neuronales, donde no hay ninguna neurona. La flecha indica el contorno de la microgota de colágeno. La barra de calibración indica 100  $\mu$ m.



La placa con las neuronas recién sembradas, se deposita en un incubador a 37° C y 8 % CO<sub>2</sub> y se evita la perturbación hasta el primer cambio de medio de cultivo.

#### Mantenimiento de los microcultivos neuronales:

Transcurridos dos días del establecimiento del cultivo de neuronas, se realiza un reemplazamiento parcial del medio de cultivo. Ignorando el mínimo efecto de evaporación que se puede producir por el hecho de tener la placa en el incubador, se retiran 500 µL y se añaden 500 µL de medio de cultivo fresco. En este cambio de medio se adicionan los factores tróficos NGF-7S y CNTF. La cantidad de los factores de crecimiento en el medio de cultivo nuevo, es la necesaria para que se alcancen una concentración de 500 nM de NGF-7S y de 2 nM de CNTF por pocillo. En el caso de las células tratadas con SPARC (942-SP R&D Systems) se añade la proteína a la concentración final deseada. Lo mismo se realiza con los péptidos derivados de SPARC.

El cambio de medio se realiza cada dos días hasta un total de 14-18 días en cultivo. Para disminuir la variabilidad de las respuestas entre los microcultivos, las microislas de una única neurona (SCM o autóptica) seleccionadas para ser registradas contienen una gran cantidad de procesos, con un tamaño de entre 100 y 300 µm, cubriendo por completo el campo visual de una imagen de contraste de fase con un objetivo de 40 aumentos (Fig. M6).

## **1.2. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES.**

Para la producción de lentivirus como herramienta de transgénesis en las neuronas, se usa puntualmente a lo largo de esta tesis, la línea celular HEK-293T. Las células HEK-293 pertenecen a una línea celular aislada de riñón embrionario humano (*Human Embryonic Kidney*). Una variante importante de esta línea celular es la 293T que contiene, además, el antígeno SV40-T, que permite la replicación episomal de los plásmidos transfectados que impican el origen de replicación de SV40. Esto permite la amplificación de plásmidos transfectados y la expresión temporal prolongada de los productos génicos deseados. Para el cultivo de esta línea celular, se emplea un medio de cultivo con las siguiente composición:

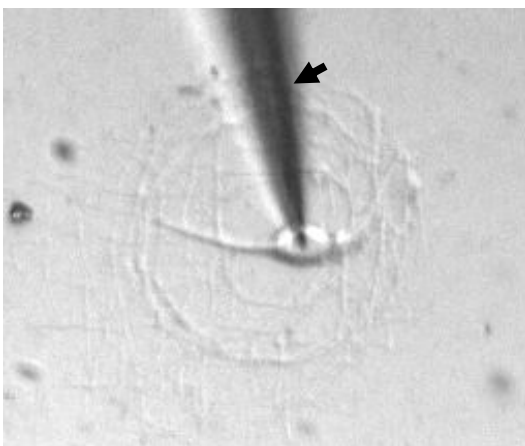
- DMEM:F12 (1:1) con Glutamina y sin HEPES (Gibco®, ref: 11320-033)
- 10 % (v/v) FBS (Invitrogen)
- 1 % (v/v) P/E (Sigma-Aldrich, ref: P0781)

El cultivo de la línea celular se realiza a partir de alícuotas de 1 mL de células congeladas en nitrógeno líquido. Se encuentran crío-preservadas en un medio completo con 10 % (v/v) de DMSO. La alícuota se descongela y se transfiere a 5 mL de medio de cultivo con 10 % de suero y 1 % P/S contenido en una placa de cultivo celular de 10 cm de diámetro, y se mantiene en un incubador a 37° C y 5 % CO<sub>2</sub>. Se hacen pases de células, para mantener la viabilidad celular, cuando la confluencia de las células en la placa está próxima al 90-95 %. Las células son transferidas a placas de cultivo de 15 cm de diámetro siempre que tengan un número de pases totales inferior a 23, para llevar a cabo el protocolo de producción de lentivirus (apartado 5 de en Materiales y Métodos).

## 2. ELECTROFISIOLOGÍA.

Las neuronas autápticas se presentan como un modelo de circuito neuronal en el que son presinápticas y postsinápticas en sí mismas. Esto simplifica algunas técnicas, ya que permiten generar un potencial de acción y registrar la respuesta postsináptica empleando un único electrodo, que es a la vez de estimulación y de registro.

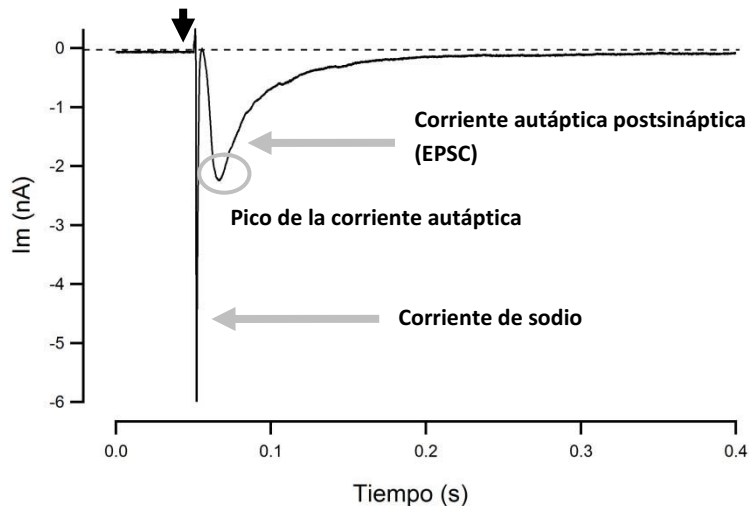
Se emplea la técnica de *Patch-Clamp* en su modalidad de fijación de voltaje (*Voltage-Clamp*). Los registros se hacen en la configuración de *whole-cell* en la que la membrana de la célula se rompe para acceder a su interior, a través de la pipeta de registro con un electrodo en su interior (Fig. M7). La pipeta contiene la solución interna (ver composición en 2.1) que dializa dentro del soma de la célula.



**Figura M7. Imagen en contraste de fase de una SCM registrada.** El acceso al interior de la neurona se hace en el soma celular. Mediante una pipeta de vidrio (flecha) se genera un parche sobre la membrana y tras succiones sucesivas se consigue perforar y acceder al interior celular. Su voltaje es fijado a -60 mV. La estimulación y el registro se realizaron con el mismo electrodo que se encuentra dentro de la pipeta.

## 2.1. EXPERIMENTOS DE *VOLTAGE-CLAMP*.

En los experimentos de *Voltage-Clamp*, en la configuración de *whole-cell*, el voltaje de la membrana de las neuronas autápticas es fijado a -60 mV, en reposo. Cuando se aplica un pulso despolarizante, se lleva el potencial de membrana hasta 0 o 10 mV durante 2 ms, provocando la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje que genera un potencial de acción que evoca una respuesta sináptica, EPSC.



**Figura M8. Registro de *voltage-clamp* de una neurona autáptica.** El potencial de acción generado por el estímulo eléctrico (flecha negra) aparece como una corriente de entrada de sodio que se propaga a través del axón. Este potencial de acción genera la consecuente corriente postsináptica autáptica que aparece con un retraso de 10 ms. En nuestro sistema colinérgico, esta corriente es debida a la entrada de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$  a través de los receptores postsinápticos.

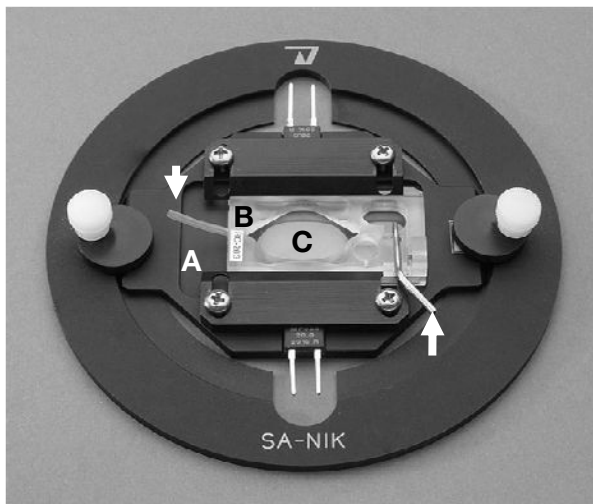
En el registro asociado a la aplicación de un estímulo despolarizante que se observa en la Fig. M8, inicialmente ocurre una corriente debida a la entrada de sodio que inicia el potencial de acción (corriente de estimulación). Entre 5 y 15 ms después se observa una corriente de entrada, debida a la generación de un EPSC o corriente autáptica. El pico del EPSC es el punto de máxima sincronización de la liberación de las vesículas (Stevens & Williams, 2007).

Debido a que los registros se hacen sobre el soma de la neurona y los procesos neuronales son prolongados y tortuosos, existe una limitación espacial de la fijación del voltaje (*space-clamp*) y un filtrado por el cableado neurítico que reduce la contribución de las sinapsis axodendríticas en la respuesta final (Ulrich & Lüscher, 1993). De esta forma en el análisis y en posteriores cuantificaciones, solamente se consideran las sinapsis axosomáticas como las contribuyentes a la corriente autáptica o EPSC.

### 2.1.1. Material.

#### Soporte para los registros:

Para llevar a cabo los registros, los cubreobjetos con microcultivos de entre 14 y 19 días de cultivo *in vitro* (DIV) se colocan en una cámara de registro (Warner Instrument, Hamden, USA, modelo RC-25F, Fig. M8B) con un orificio en la base inferior de diámetro menor al del cubreobjetos, que permite el enfoque del objetivo del microscopio (figura M8C), y unos orificios de entrada y salida que facilitan la perfusión de la solución externa de baño (tabla M4). La cámara de registro va sellada con grasa a un soporte (Fig. M8A), a fin de evitar la fuga de solución externa de registro, y todo este montaje, se coloca en la platina del microscopio invertido Olympus IX-71. En el compartimento de perfusión de la cámara, se monta un electrodo clorado que está en contacto con el baño de solución que cubre a las células y se usa como electrodo de referencia "tierra".



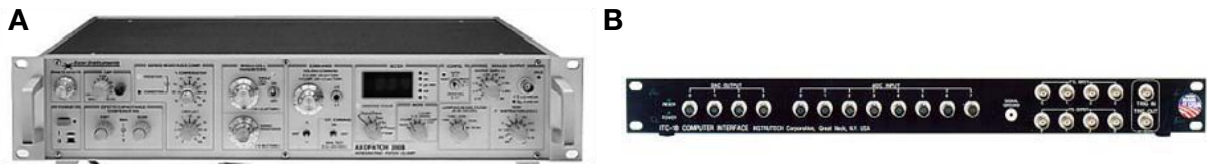
**Figura M8. Cámara y soporte de registro.** Soporte sobre el que se pone el cubreobjetos (A) en su orificio central, y sobre el que se coloca la cámara de registro (B) sellando ambas partes con una grasa que genera vacío, y quedando el cubreobjetos en medio de ambas (C). La cámara de registro contiene un compartimento central hueco que se llena de solución externa de registro, bañando las neuronas. Esta solución perfunde entrando y saliendo por unos orificios laterales (flechas) que permiten un flujo continuo.

Sobre la platina de registro se coloca el preamplificador (*CV-4 Headstage, Gain X1/100, Axopatch Instrument, USA*). En él se encaja un soporte (*holder*) con la pipeta de registro, que contiene una solución interna (tabla M4) y un electrodo de plata clorado, en contacto con el soporte por una clavija de oro. De dicho soporte parte un tubo que, siguiendo un circuito, permite la succión directa con la boca para generar un vacío y así realizar un sello y la posterior apertura de la membrana de la célula (*patch-clamp*: paso de la configuración *on-cell* a *whole-cell*).

#### Setup de registro:

El cabezal pre-amplificador está conectado a un amplificador para magnificar la corriente eléctrica generada por las neuronas (Fig. M9A). El amplificador es un

*Axiopatch-1D* (Molecular Devices, CA) acoplado por una interfase ITC-18 (Fig. M9B, Instrutech, Great Neck NY, USA) al *software* WCP (University of Strathclyde, <http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/page>).



**Figura M9. Preamplificador, amplificador e interfase.** A) Amplificador *Axiopatch-200B* y el pre-amplificador "*Headstage*". B) Interfase ITC-18 de Instrutech que permite pasar de las señales analógicas del amplificador a la digital del *software*.

### Pipetas de registro:

Para los registros se usan pipetas de borosilicato con filamento interior, de diámetro interno y externo 0.69 y 1.2 mm respectivamente (Harvard Apparatus). La forma óptima de la punta es crucial para el establecimiento del sellado sobre la membrana de la neurona y el su mantenimiento fidedigno durante todo el registro. El aparato usado para diseñar la punta idónea para los registros es un *Micropipette puller* de forja horizontal (modelo P-97, Sutter Instruments, USA, Fig. M10).



**Figura M10. *Micropipette puller* y pipeta de registro.** A) Aparato de forja horizontal para diseñar micropipetas de registro. B) Ejemplo de una punta de una micropipeta de registro. La forma es crucial para generar un sello con la membrana de la célula, romperla y mantener la resistencia en serie durante todo el registro.

La resistencia que genera la pipeta utilizada en el baño es de 3-5 M $\Omega$ .

Soluciones:

Solución externa (mM)	Solución interna (mM)
NaCl 130 mM	Gluconato potásico 130 mM
KCl 2.7 mM	Hepes (no semi-sodio) 10 mM
Sal de Hepes Semi-sodio 10 mM	EGTA 0.02 mM
MgCl <sub>2</sub> 2 mM*	Na <sub>2</sub> ATP 3 mM
Glucosa 10 mM	NaGTP 1 mM
CaCl <sub>2</sub> (2-4) mM*	MgCl <sub>2</sub> 2 mM*
pH 7.4 (ajustado con NaOH)	pH 7.2 (ajustado con KOH)
Ajustada a 290 mOsmol kg <sup>-1</sup> antes de añadir Glucosa.	Ajustada a 290 mOsmol kg <sup>-1</sup>
Resulta ~ 300 mOsmol kg <sup>-1</sup> tras añadir Glucosa y CaCl <sub>2</sub> .	
*Ambas a partir de soluciones comerciales a 1 mM	

Tabla M4. Soluciones de registro.

Durante los registros las neuronas se encuentran sometidas a un baño de solución externa mediante un flujo constante.

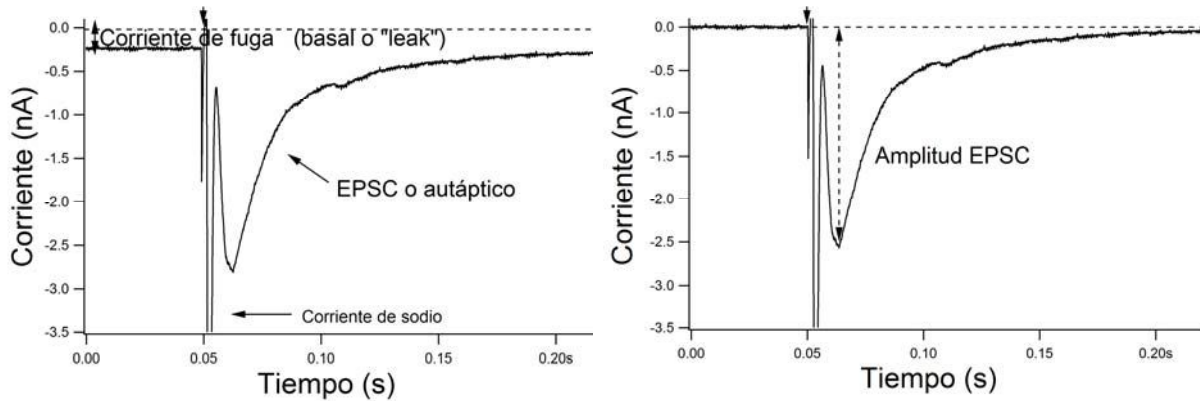
En función de los experimentos, se requiere el uso de diferentes sustancias directamente sobre el soma de la neurona (perfusión local) o en el flujo de perfusión de la solución externa. Estas sustancias y sus concentraciones se explican detalladamente en los capítulos de resultados correspondientes.

## 2.2. ANÁLISIS DE LOS REGISTROS DE *VOLTAGE-CLAMP*.

En los registros de *Voltage-Clamp* obtenemos dos tipos de respuestas en función del estudio: a) Registros de respuesta evocada; b) Registros de respuesta espontánea. El análisis se realiza mediante *macros* en el *software* Igor Pro 6.0 (Wavemetrics, Oregon, USA)

a) Registros de respuesta evocada, EPSC. Todos los trazos de registros de *voltage-clamp* se representan sin la corriente de estimulación de sodio, ya que el interés reside en la respuesta autáptica evocada. Para el análisis se considera la amplitud del pico de la corriente autáptica. Previamente se substraen la corriente

basal del registro (Fig. M11). Se descartan corrientes con un basal superior al 10 % de la corriente autóptica resultante, o mayores a 300 pA, ya que indica un mal sellado y mantenimiento del voltaje en la técnica *voltage-clamp*. Un mal sellado genera una corriente de fuga (corriente *leak*) entre la pipeta y la célula que escapa al exterior. Por tanto, la respuesta puede no ajustarse a la realidad.



**Figura M11. Registros de *voltage-clamp* asociados a un estímulo despolarizante en un SCM antes y después de substraer la corriente de fuga.** A) Antes de la aplicación del estímulo despolarizante (cabeza de flecha superior) existe una corriente basal que corresponde a la corriente de fuga o "leak" entre la membrana de la célula y la pipeta de registro. Tras el estímulo aparece la corriente de despolarización, de sodio (parcialmente representada), y posteriormente la corriente autóptica evocada o EPSC en forma de gaussiana invertida. B) Se substraen la corriente de fuga o basal, llevándola al valor cero, y esto permite calcular la amplitud de la corriente autóptica evocada (línea punteada de doble cabeza de flecha).

b) Registros de respuesta espontánea, mEPSCs o "minis". No son evocados por un estímulo eléctrico sino que corresponden a la liberación de una o varias vesículas sinápticas. Se cuantifica la amplitud de la corriente del mEPSCs y se calcula la frecuencia. El valor de amplitud mínimo de un mEPSC se estima en 15 pA, que corresponde aproximadamente tres veces la desviación estándar del ruido.

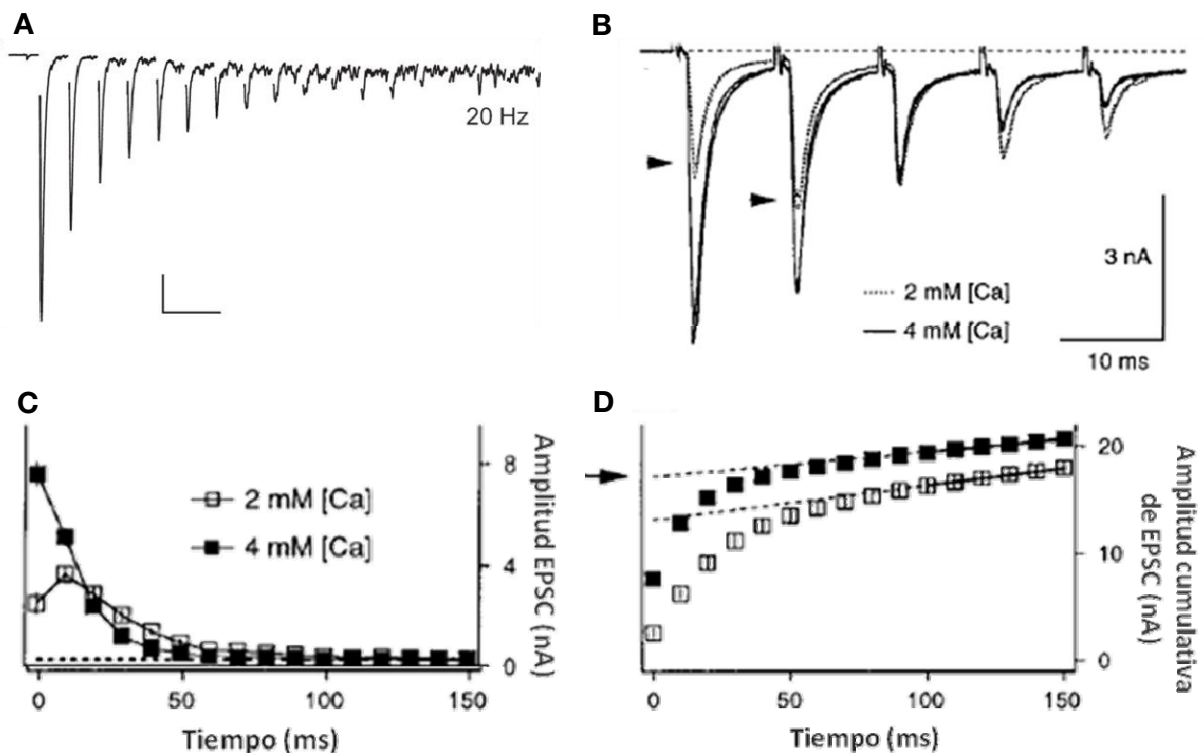
### 2.2.1. Estimación funcional del RRP.

Clásicamente se han empleado dos métodos:

*i)* Aplicación local de una solución de alta osmolaridad, que provoca la completa fusión de las vesículas ancladas a la superficie plasmática (Stevens & Tsujimoto, 1995; Rosenmund & Stevens, 1996; Rizzoli & Betz, 2004; Ikeda & Bekkers, 2009). La ventaja de esta estimación es su independiencia de calcio (Rosenmund & Stevens, 1996).

*ii)* Aplicación de un tren de estímulos a alta frecuencia ( $> 10$  Hz) que agota progresivamente el RRP. Con los estímulos se alcanza la depresión sináptica que llega a un estado estacionario (Fig. M12). El análisis cumulativo de los EPSCs

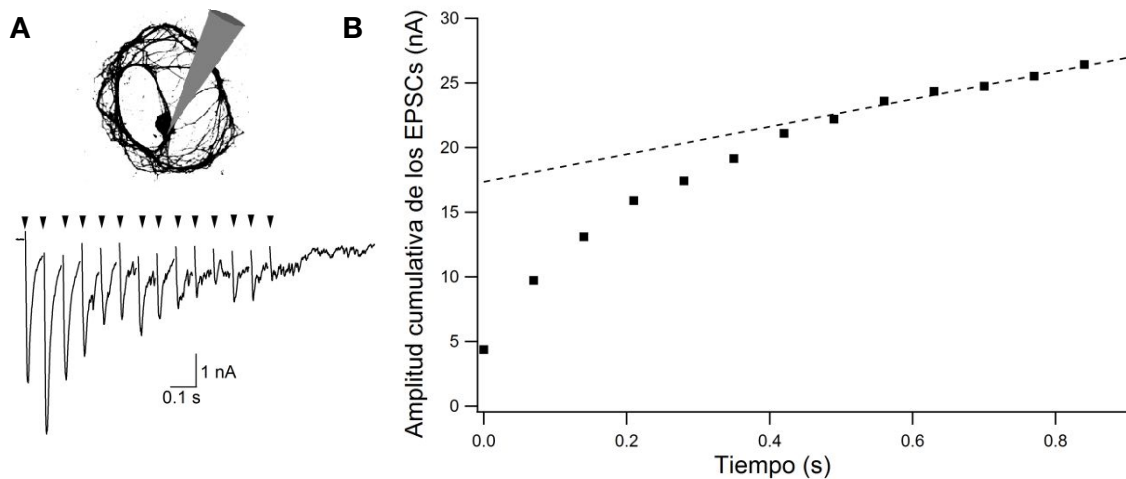
evocados respecto al tiempo, permite ajustar una función lineal al estado estacionario de la depresión, cuya extrapolación con el eje de ordenadas proporciona el valor estimado del RRP (Fig. M12D, Schneggenburger et al., 1999). Este mecanismo es dependiente de toda la maquinaria exocítica y por lo tanto también de calcio. Así, una probabilidad de liberación incrementada con este ión, favorece una mayor exocitosis que conlleva a una depresión más pronunciada (Fig. M12B y C) y una anterior llegada al estado estacionario (Schneggenburger et al., 1999; Stevens & Williams, 2007). Los EPSCs sólo abarcan los eventos sincrónicos con cada potencial de acción, no incluyendo los mEPSCs asincrónicos observados tras la estimulación, que también pueden ser vesículas del RRP.



**Figura M12. Estimación del tamaño del RRP mediante la aplicación de un tren de estimulación a alta frecuencia.** A) EPSCs evocados frente a un tren de estímulos a 20 Hz en neuronas hipocámpales. Obsérvese la depresión en la corriente tras 4-5 potenciales de acción. Barras de calibración, 500 pA y 100 ms.. B) Diferencia en el EPSC evocado en función del  $[Ca^{2+}]_{ext}$ . Aunque a 4 mM la amplitud de los primeros EPSCs es mayor, se alcanza antes la depresión que a 2 mM. Sinapsis del *Calyx of Held* a 100 Hz. C) Medida de las amplitudes de los EPSC evocados a lo largo del tren a 100 Hz de (B). D) Análisis cumulativo de los EPSC evocados en (B) y (C). El estado estacionario de la depresión permite ajustar una función lineal cuya extrapolación con el eje de ordenadas proporciona la estimación del tamaño del RRP. A modificada de (Stevens & Williams, 2007); B, C y D de (Schneggenburger et al., 1999).

En las neuronas autápticas del SCG, se estima el tamaño del RRP de forma funcional, mediante un tren de estímulos a 14 Hz, y se ha realizado el análisis cumulativo de los EPSCs evocados (Fig. M13), propuesto por Neher y colaboradores (Schneggenburger et al., 1999).





**Figura M13. Estimación del tamaño del RRP mediante un tren de estímulos a alta frecuencia.** A) EPSCs evocados por la aplicación de un tren de pulsos eléctricos de alta frecuencia (flechas), 14 Hz, en una neurona autáptica. A partir de 6-7 estímulos se observa una marcada depresión en la neurotransmisión respecto a los primeros EPSCs, que alcanza un estado estacionario hasta el final del tren de estímulos. B) Representación de los valores cumulativos de los EPSCs evocados frente al tiempo. El estado estacionario alcanzando se ajusta a una recta de regresión lineal. La extrapolación de dicha recta a tiempo 0 proporciona el valor cuantal liberado en el RRP, antes de ser rellenado de nuevo.

### 2.3. REGISTRO DE FLUORESCENCIA SIMULTÁNEA A LA ELECTROFISIOLOGÍA.

Se infectan SCMs con lentivirus (ver apartado 5 de materiales y métodos) para expresar proteínas marcadas con GFP, y monitorizar su comportamiento durante la estimulación.

Se estudia la isoforma neuronal de la cadena ligera de clatrina (nLCa) marcada con la proteína verde fluorescente intensificada (EGFP). La proteína se expresa con un patrón de puntos discretos de 1-1.5  $\mu\text{m}$ . Estos puntos colocalizan con otras proteínas presinápticas, VAMP-2 y sinaptofisina, por inmunofluorescencia. Además, colocalizan con los puntos definidos con el colorante estirílico FM4-64. Así, asumimos que nLCa se acumula en las sinapsis. Para el estudio, se selecciona una región de interés alrededor del punto de fluorescencia en la que no hay interferencia entre el punto y alrededores, y se ajusta la ganancia a un valor de fluorescencia entre 180-220 u.a. para poder estudiar los cambios sin presentar saturación.

La fuente de luz corresponde a un láser de Argón acoplado al microscopio (Melles Griot, NY, USA), que excita a la longitud de onda 488 nm. La fluorescencia se adquiere usando un dicroico q505LP y un filtro de emisión HQ535/50m (Chroma). Los objetivos utilizados son:

- LD Plan-Neofluar 40x, 0.6 NA (Zeiss), que es un objetivo de no inmersión.

- TIRFM 60x, 1.45 NA oil (Olympus), que es un objetivo de aceite de inmersión.

Los experimentos se comenzaron con el objetivo de 40x, pero para conseguir mayor resolución se utilizó un objetivo de mayor apertura numérica (*NA*), 1.45.

Irradiando con el láser de excitación a 488 nm usando el objetivo de no inmersión de 40x y una apertura numérica de 0.6, obtenemos una resolución de 496 nm, mientras que con el objetivo de inmersión de 60x y una apertura numérica de 1.45, obtenemos una resolución de 205 nm, es decir, somos capaces de diferenciar distancias mínimas de 0.2  $\mu\text{m}$  entre dos puntos. Asumiendo que los puntos de fluorescencia que definen una sinapsis tienen un diámetro de 1 - 1.5  $\mu\text{m}$ , se puede estudiar el movimiento y difusión de estos puntos y su intensidad de fluorescencia con precisión.

Las imágenes son capturadas a 3 Hz de frecuencia, por la cámara EM-CCD C-9100 y su programa Hokawo (Hamamatsu), asociadas a órdenes TTL del *software* de registro, WCP.

El colorante de estirilo FM4-64 (máximos de excitación / emisión de  $\sim 515/640$  nm), para identificar las sinapsis, fue disuelto en la solución externa de registro. Con la subsecuente endocitosis tras la exocitosis, se captura el colorante en el interior de las vesículas sinápticas, marcando puntos de 1-1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, que corresponden a terminales presinápticos, ya que la fluorescencia disminuía con una nueva estimulación. El 80 % de los puntos colocan con los definidos por la infección de nLCa-GFP. Para observar la fluorescencia que ofrece este colorante se utilizó una lámpara de mercurio (U-RFL-T, Olympus) y un filtro de excitación 560/40x y uno de emisión 610LP (Chroma).

## **2.4. ANÁLISIS DE LA FLUORESCENCIA SIMULTÁNEA A LA ELECTROFISIOLOGÍA.**

El análisis de las imágenes de nLCa-EGFP se realiza con el programa ImageJ. Se selecciona una región de interés (*ROI, region of interest*) de 1.3 x 1.3  $\mu\text{m}$  alrededor del punto de fluorescencia. La captura de las imágenes se lleva a cabo durante un período basal, un período de tren de estimulación de las neuronas, y un período de recuperación. El análisis de la fluorescencia se hace estudiando los cambios relativos al período basal ( $F_{\text{sin}}/F_{\text{sin}_0}$ ). Como la exposición prolongada del fluoróforo al láser genera fotoblanqueo, este fenómeno se corrige estimando la fluorescencia relativa al período basal ( $F_{\text{dend}}/F_{\text{dend}_0}$ ) de otra región dendrítica donde

no hay puntos de sinapsis pero en la que sí hay señal de fluorescencia. Seleccionamos tres ROI de este tipo, y se realiza el promedio. Así, el cambio en la fluorescencia del punto de nLCa-EGFP que hemos estudiado durante los diferentes períodos anteriormente mencionados se define como:  $\Delta F = (F_{\text{sin}}/F_{\text{sin}_0}) - (F_{\text{dend}}/F_{\text{dend}_0})$ . Cuando este procedimiento es aplicado a microcultivos que no presentan EPSCs,  $\Delta F=0$ , indicando que el cambio en la fluorescencia no es debida a fotoblanqueo.

### 3. INMUNOFLUORESCENCIA CORRELATIVA A LA ELECTROFISIOLOGÍA.

En esta tesis, todos los SCMs inmnomarcados son previamente registrados. Se correlacionan los niveles de expresión de las proteínas sinápticas con la respuesta sináptica, para asegurar que los SCMs presentan sinapsis funcionales. Las neuronas que no presentan EPSCs son descartadas del estudio. La inmunofluorescencia correlativa a la electrofisiología se realiza de la siguiente manera:

a) Durante el registro se micrografía a la célula para su posterior identificación con la cámara EM-CCD Digital Camera C9100 Hamamatsu (Japón) asociada al microscopio de registro. El programa de procesamiento de la imagen es Hokawo 2.1 pf07.

b) Inmediatamente después del registro, el cubreobjetos con el microcultivo registrado se fija con paraformaldehído al 4 % en PBS 1X, durante 15 min a temperatura ambiente.

c) Se hacen tres lavados de 5 minutos cada uno, con solución PBS 1X a temperatura ambiente.

d) Se realiza una etapa de permeabilización previa con PBS 1X y 0.3 % de Tritón-X100 durante 30 minutos en agitación suave y temperatura ambiente.

e) Se realiza una etapa de bloqueo para evitar unión inespecífica de los anticuerpos usando una solución con suero de cabra (NGS) al 20 %, Tritón-X100 al 0.1 % y Gelatina al 0.2 % en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave.

f) El anticuerpo primario se incuba durante toda la noche a 4 °C en una solución similar a la de bloqueo pero con 1 % de NGS. Se aplica una agitación suave.

g) Al día siguiente se realizan tres lavados de 10-15 minutos con solución de bloqueo a temperatura ambiente.

h) Se incuba el anticuerpo secundario específico a una dilución 1:500, conjugados con fluorocromos AlexaFluor 488, AlexaFluor 555 y AlexaFluor 647 (Molecular Probes). Este paso se realiza en ausencia de luz, durante 1.5 horas y con una agitación suave.

i) Se hacen tres lavados con una solución de 0.1 % Triton-X100 en PBS 1X, y se procede al montaje de los cubreobjetos sobre portaobjetos, mediante medio de montaje Fluoromount (Sigma). Siempre en ausencia de luz.

Posteriormente se identifican los SCMs registrados y según el requerimiento del experimento, las muestras se procesan en:

- Microscopio de campo amplio Zeiss, modelo Axio Examiner.A1, acoplado a una cámara AxioCam MRc5 y el *software* AxioVision 4.7 para adquirir las imágenes.
- Microscopio Confocal Espectral Leica TCS-SL y las imágenes se adquieren con el programa Leica Confocal Software (LCS), en los Servicios Científicos Técnicos de la Universidad de Barcelona.

Las imágenes se adquieren centradas en el soma de la célula y ajustando los valores de fluorescencia a 160-210 u.a.

En los experimentos de RNAi para la cadena pesada de clatrina (CHC), se ajustan los valores de fluorescencia para los SCMs infectados con el virus control EGFP a 160-210 u.a.

El procesamiento de todas las imágenes se lleva a cabo con el programa ImageJ.

Los anticuerpos utilizados para la inmunofluorescencia de SCMs son:

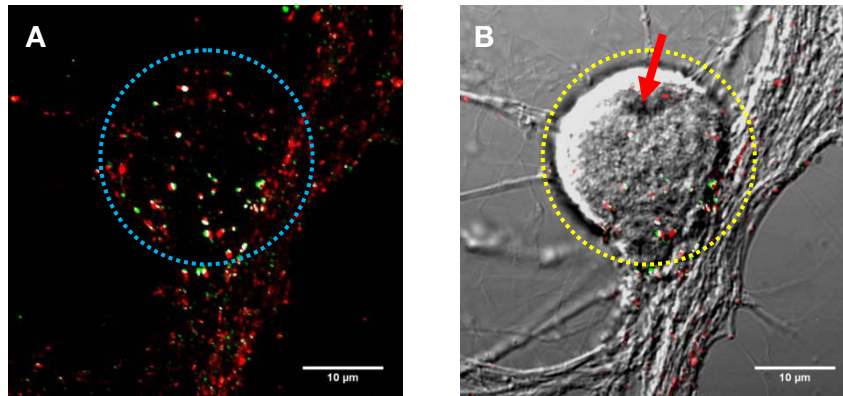
Anticuerpo primario	Origen	Concentración	Referencia
Anti-Bassoon (monoclonal)	Ratón	1:1000	Enzo (SAP7F407)
Anti-Sinaptofisina (policlonal)	Conejo	1:500	Synaptic System (101002)
Anti-VAMP2 (monoclonal)	Ratón	1:1000	Synaptic System
Anti-Cadena pesada de Clatrina (CHC) (X22) (monoclonal)	Ratón	1:2500	Calbiochem (CP45)
Faloidina-atto 488	-----	1:500 (stock 0.1 mM)	Sigma (49409)

Tabla M5. Anticuerpos para la inmunofluorescencia de los SCMs

### 3.1. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE CONTACTOS AXOSOMÁTICOS EN UN MICROCULTIVO.

El análisis se realiza con el programa ImageJ. Las sinapsis potenciales se definen como estructuras redondas correspondientes a puntos discretos de bassoon con un área entre 0.3 y 3  $\mu\text{m}^2$ , los cuales aparecen entre 2 y 5 secciones

consecutivas del confocal, abarcando aproximadamente 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  (Fig. M14). La cuantificación del número de sinapsis se realiza por unidad de superficie, y se consideran principalmente las axosomáticas, es decir, las centradas en el soma y alrededores. Se considerarán sinapsis funcionales las que colocalizan con sinaptofisina.



**Figura M14. Imagen de microscopio confocal y contraste de fase. Inmunofluorescencia de proteínas sinápticas.** A) Imagen de microscopio confocal donde están marcadas, por inmunofluorescencia, las proteínas presinápticas bassoon (verde) y sinaptofisina (rojo). Los puntos blancos indican los píxeles de colocalización entre ambos marcajes. Sólo se cuantifican los puntos delimitados en el soma (línea de puntos azul) de la neurona autóptica que indican los terminales presinápticos de las sinapsis axosomáticas. B) Imagen de contraste de fase compuesta con la imagen de microscopía confocal (A), donde se observa el soma de la célula (línea de puntos amarilla) y la hendidura resultante del registro electrofisiológico (flecha roja). Esta neurona fue registrada y se cuantificó por IF el número de contactos axosomáticos.

### 3.2. INMUNOFLUORESCENCIA DEL GANGLIO CERVICAL SUPERIOR.

Los ganglios cervical superior extraídos entre P0 y P20 días, fueron fijados durante 72 h en paraformaldehído 4% y PBS1x. Posteriormente se colocaron en sacarosa al 30% donde se podían conservar durante semanas. Tras colocarlos en bloques de OCT, fueron cortados en rodajas de 10-15  $\mu\text{m}$  y colocados en portaobjetos para inmunofluorescencia. El protocolo es el siguiente:

a) Se hacen tres lavados de 5 minutos cada uno, con solución PBS 1X a temperatura ambiente.

b) Se realiza una etapa de permeabilización previa con PBS 1X y 0.3% de Tritón-X100 durante 15 min en agitación suave y temperatura ambiente.

c) Se realiza una etapa de bloqueo para evitar unión inespecífica de los anticuerpos usando una solución con suero bovino fetal (FBS) al 20%, Tritón-X100 al 0.2% y PBS 1X, durante 1 h a temperatura ambiente y agitación suave.

d) El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4 °C en una solución similar a la de bloqueo pero con 2% de FBS. Se aplica una agitación suave.

e) Al día siguiente se realizan tres lavados de 5 minutos con PBS 1X a temperatura ambiente.

f) Se incuba el anticuerpo secundario específico a una dilución 1:500, conjugados con fluorocromos AlexaFluor 488, AlexaFluor 555 y AlexaFluor 647 (Molecular Probes). Este paso se realiza en ausencia de luz, durante 2 h y con una agitación suave.

g) Se hacen tres lavados con PBS 1X durante 10 min, y se procede al montaje de cubreobjetos sobre los portaobjetos con la muestra, mediante medio de montaje Fluoromount (Sigma). Siempre en ausencia de luz.

Los anticuerpos utilizados son:

Anticuerpo primario	Origen	Concentración	Referencia
Anti-SPARC (policlonal)	Cabra	1:300	RD System
Anti-VAMP2 (monoclonal)	Ratón	1:500	Synaptic System

Tabla M6. Anticuerpos de uso en el ganglio cervical superior

#### 4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA CORRELATIVA A ELECTROFISIOLOGÍA.

Este protocolo se realiza con microcultivos crecidos en cubreobjetos de un material plástico, thermanox.

La mayoría de los productos químicos usados en este procedimiento son tóxicos y nocivos para uno mismo o para el entorno, por lo tanto hay que mantener las reglas de seguridad que cada producto exige e ir siempre vestido con bata y doble guante.

Las neuronas son previamente registradas para conocer su respuesta autóptica. Durante su registro son fotografiadas para localizarlas posteriormente. Inmediatamente después del registro son fijadas y comienza el procedimiento.

##### 4.1. Material.

###### Equipamiento:

- Bata de laboratorio, guantes de nitrilo (dobles) y mascarilla
- Cubreobjetos de thermanox (ver apartado 1.1. Microcultivo de neuronas)
- Bisturí
- Pinzas "Dumont Tweezers #55" (ref: 14099, World Precision Instruments Ltd, UK), exclusivas para el uso en este protocolo
- Placa para cultivos de 12 pocillos

- Placa de cultivos de 6 pocillos, recubiertos los 6 de papel de aluminio. O, en su defecto pocillos de vidrio (Glass Microbeaker, 2.5 mL, ref. 60982, Electron Microscopy Science (EMS))
- Soporte para los pocillos de vidrio (Microbeaker holder for 25 mm diam., ref. 72645-10, EMS)
- Recipiente de forexpán con hielo
- Aceite vegetal
- Cápsulas de plástico BEEM (*Better Equipament for Electron Microscopy*) Embeddign Capsule (size #3, ref. 69910-01, EMS)
- Soporte para las cápsulas BEEM (Beem embedding capsule holder, for size #3, ref. 69917-01)
- Horno a 60° C

#### Soluciones:

- Solución de fijación: 1.8 % de glutaraldehído en cacodilato sódico 0.1 M. Para preparar 50 mL de la solución fijadora (se prepara bajo campana de extracción y con mascarilla):
  - 3.6 mL de solución de glutaraldehído al 25% (ref. 16216, EMS)
  - 46.4 ml de cacodilato sódico 0.1 M (pH 7.6) (ref. 11650, EMS)

La osmolaridad debe ser ajustada entre 290-320 mOsmol/kg<sup>-1</sup> con agua bidestilada.
- Tampón cacodilato sódico 0.1 M
- Tampon cacodilato sódico 0.05 M
- Solución al 1 % de tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) y al 3 % de ferricianida potásica en cacodilato sódico 0.1 M. Esta solución es muy tóxica. El manejo y la preparación deben hacerse bajo campana de extracción, con doble guante, bata y mascarilla. Se prepara de la siguiente manera:
  - 2 mL de OsO<sub>4</sub> acuoso al 4 % (ref. 19150, EMS)
  - 0.12 g de Ferricianida potásica (ref. 20150, EMS)
  - 6 mL de cacodilato sódico 0.1 M
- Solución al 1 % de ácido tánico en cacodilato sódico 0.05 M. Se prepara como sigue:
  - 0.01 g de ácido tánico (ref. 21700, EMS)
  - 10 mL de cacodilato sódico 0.05 M

Agitar vigorosamente hasta la completa disolución

- Etanol al 70 % (v/v) en agua bi-destilada
- Etanol al 90 % (v/v) en agua bi-destilada
- Etanol al 100 % (v/v)
- Solución de óxido de propileno (ref. 20410, EMS). Es muy volátil y tóxico. Tratar bajo campana de extracción, con doble guante, bata y mascarilla. El óxido de propileno es un buen disolvente de los plásticos de laboratorio. Por ello, será utilizadas pipetas de vidrio para su extracción y pocillos de vidrio especial para microscopía electrónica o, en su defecto placas recubiertas de papel de aluminio en los pocillos.
- Resina epóxica Epon (kit comercial, ref. 13940, EMS). Para preparar 32.2 mL de esta resina epóxica:
  - 9.17 g o 8.3 mL de Embed-812 (ref. 14120, EMS)
  - 5.67 g o 5 mL de Araldite-502 (ref. 13900, EMS)
  - 18.3 g o 18.3 mL de DDSA
  - 0.57 g o 0.6 mL de DMP-30 (o 1.14 g o 1.2 mL de BDMA. Para mejor penetración y estabilidad se recomienda BDMA en vez de DMP-30).

La agitación tras la adición del catalizador DMP-30 (o BDMA) hace cambiar drásticamente el color y el brillo de la resina. Agitar vigorosamente tras la adición de todos los compuestos.

#### 4.2. Procedimiento.

Los cubreobjetos se encuentran dentro de una placa de 12 pocillos. Todos los pasos se realizan dentro de una campana de extracción y con mascarilla:

##### 1er día:

a) Se fijan las células registradas en una solución al 1.8 % de glutaraldehído en cacodilato sódico 0.1 M.

La fijación es un paso muy importante. Puesto que las células son registradas, es necesario comprobar la osmolaridad de solución fijadora, ya que si tiene una alta osmolaridad, las membranas internas colapsan, y la imagen obtenida no es representativa.



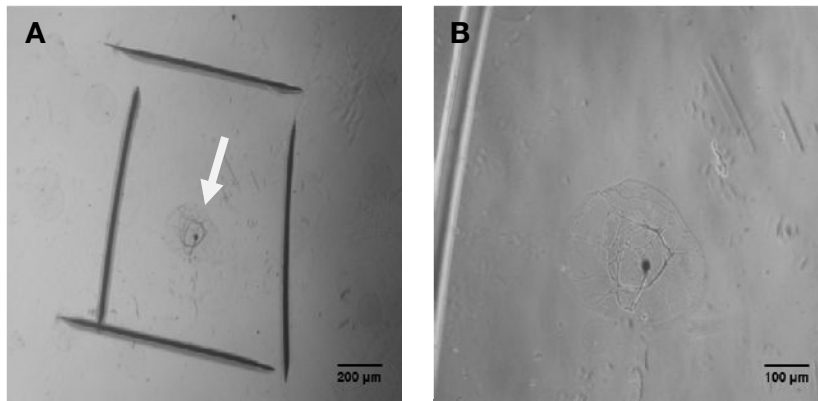
En nuestro laboratorio, las células registradas son fijadas al 1.8 % de glutaraldehído en cacodilato sódico 0.1 M (320 mOsm, que es fisiológicamente aceptable). Las células son fijadas en dos etapas:

- i) dejarlas en solución fijadora durante 20 minutos a temperatura ambiente
  - ii) posteriormente dejarlas en solución fijadora 20 minutos a 4° C
  - b) Se realizan tres lavados con cacodilato sódico 0.1 M.
  - c) Se incuban con una solución al 3 % de ferricianida potásica y al 1 % de OsO<sub>4</sub> en cacodilato sódico 0.1 M, durante 1 hora colocando la placa de 12 pocillos en un recipiente de forexpán relleno de hielo, tapado para mantener la oscuridad.
- IMPORTANTE: Todo el material con restos de OsO<sub>4</sub> se colocan en un tubo de plástico marcado correctamente indicando que hay restos de osmio, donde la mitad del volumen serán restos de tetróxido de osmio y el resto aceite vegetal, que inactiva dicho óxido. Cada recipiente relleno de esta forma será perfectamente cerrado y depositado en un contenedor de residuos tóxicos, junto con el material que haya estado en contacto con esta sustancia.
- d) Se elimina el OsO<sub>4</sub> y se hacen dos lavados con cacodilato sódico 0.1 M. Es preferible cambiar los cubreobjetos de pocillo para no arrastrar restos de osmio.
  - e) Se incuba con solución al 1 % de ácido tánico en cacodilato sódico 0.05 M (dilución 1:2 de cacodilato sódico 0.1 M) durante 45 minutos en la oscuridad (cubrir con papel aluminio) a temperatura ambiente.
  - f) Lavar dos veces con solución de cacodilato sódico 0.05 M.
  - g) Lavar una vez durante 5 minutos en agua bidestilada.
  - h) Lavar dos veces durante 5 minutos cada lavado (2x5 min) en etanol 70%.
  - i) 2x5 min en etanol 90 %.
  - j) 2x5 min en etanol 100 %. Asegurarse que el etanol rellena totalmente el pocillo.

En este paso se puede parar si se desea y continuar el día siguiente. Para ello, conservar la placa, con los pocillos plenos de etanol 100 %, y bien cerrada a 4° C toda la noche.

#### 2do día:

k) Bajo una lupa, y con la ayuda de un bisturí y la imagen tomada durante el registro, se localiza la neurona autáptica registrada y se hace un recuadro en torno a ella (Fig. M15).

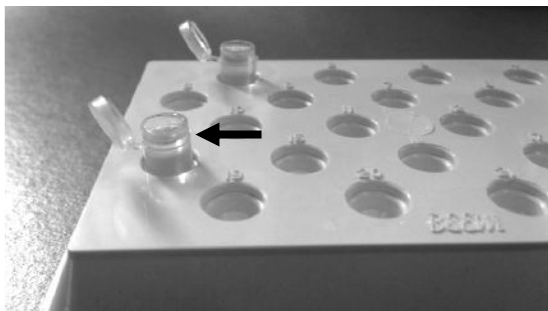


**Figura M15. Imagen de contraste de fase de las neuronas registradas y tratadas para microscopía electrónica.** A) Imagen a 10X del microcultivo con el recuadro hecho con el bisturí indicando la neurona registrada (flecha). B) Imagen a 20X. Véase el color oscuro de la neurona tras el tratamiento con tetróxido de osmio.

l) Se toman dos o tres imágenes (a 10x, 20x y 40x) para asegurar la célula registrada.

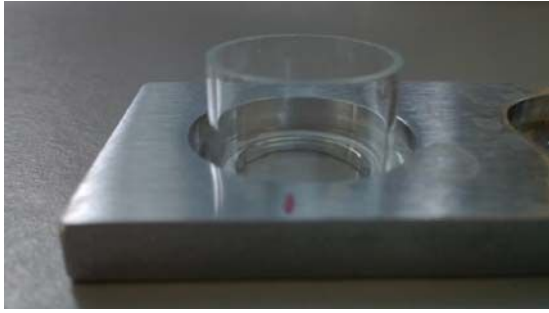
m) Se prepara la resina epóxida Epon.

**IMPORTANTE:** días previos se debe preparar resina Epon para rellenar las cápsulas *Beem* y dejarlas durante toda la noche en el horno previamente calentado a 60° C. La resina polimeriza y queda con estructura de bloque sólido con la forma de la cápsula. Si se preparan numerosos bloques, estos ya quedan hechos para sucesivas pruebas de microscopía electrónica (Fig. M16).



**Figura M16. Cápsulas Beem rellenas de resina epóxica Epon polimerizada a 60° C (flecha).**

n) Se colocan los cubreobjetos con las células en pocillos de vidrio (Fig. M17) o en su defecto en pocillos de una placa de doce pocillos recubierta de papel de aluminio. Bajo la campana de extracción y mediante el uso de mascarilla, se hace un mix 1:1 de óxido de propileno y Epon en cada pocillo. Es decir, se coloca en el pocillo 1 mL de resina Epon (siempre ésta en primer lugar, ya que el óxido de propileno es muy volátil) y a continuación se coloca el óxido de propileno con una pipeta de vidrio, y se remueve con la misma pipeta. Una vez homogeneizada la mezcla, se coloca el cubreobjetos con los microcultivos que se encuentra aún en etanol 100 %. Se mantiene durante 30 minutos, dentro de la campana de extracción y tapado para evitar la volatilización del óxido.

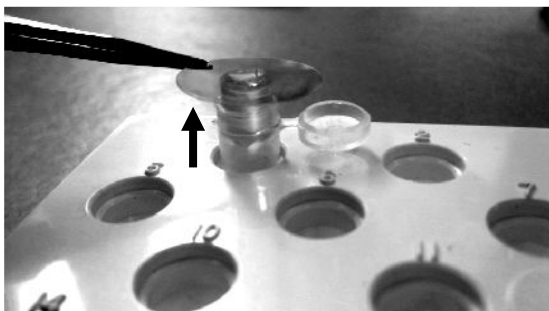


**Figura M17. Pocillo de vidrio donde se coloca el cubreobjetos durante los 30 minutos con la mezcla 1:1, óxido de propileno : Epon.**

o) Eliminar lo máximo posible la mezcla 1:1 de óxido de propileno:Epon, y reemplazar con resina Epon 100 %. Incubar durante 1 hora.

p) Quitar el Epon y reemplazar con Epon fresco e incubar durante 1 hora más.

q) Los bloques de resina polimerizada previamente formados dentro de las cápsulas, son extraídos hacia el exterior de éstas, sin llegar a sacarlos del todo, de forma que las cápsulas sigan ofreciendo sostén. De esta forma, se colocan en el soporte para cápsulas Beem. Una vez posicionados, se coge el cubreobjetos incubado con Epon con unas pinzas, y al levantarlo observamos al trasluz el recuadro hecho con el bisturí donde se encuentra la neurona requerida. Giramos el cubre, de forma que quede enfrentada la cara donde se encuentran sembradas las células con el bloque polimerizado de Epon, aprovechando la resina viscosa que resta de la incubación la posible hendidura en la base superior del bloque (Fig. M18). De esta manera, tratamos de colocar el cuadrado que contiene el microcultivo en el centro de la base superior del bloque, y nos aseguramos que no se forman burbujas en la resina, y que el cubreobjetos queda estable y no tiende a volcarse. Para asegurarnos, este proceso lo podemos hacer bajo una lupa de trabajo.



**Figura M18. Colocación del cubreobjetos sobre el bloque de resina epóxida polimerizada. La cara del cubreobjetos con las neuronas se encuentra enfrentada a la superficie superior del bloque de resina (flecha). El bloque se encuentra sostenido en un soporte para las cápsulas.**

r) Meter el soporte para las cápsulas con los bloques de resina montados con los cubreobjetos a un horno previamente calentado a 60° C. Dejarlo aproximadamente 24 horas para asegurar la correcta polimerización del Epon

viscoso y por tanto la fusión entre el cubreobjetos y el bloque de resina donde quedarán embebidas las células.

La correcta y total polimerización de la resina epóxica es fundamental para el posterior procesado de los bloques. Para ello, hemos de asegurarnos de que la temperatura del horno es de 60-65° C.

s) Tras este delicado proceso, separamos el cubreobjetos de thermanox del bloque con las neuronas embebidas. Esto se lleva a cabo de la siguiente manera: con unos fórceps se sostiene el bloque de resina, que ya hemos retirado de la cápsula que le ofrecía sostén, y sumergimos todo el bloque con el cubreobjetos adherido en un forexpán con nitrógeno líquido durante 15 segundos. Inmediatamente, con unas pinzas finas, sustraemos el cubreobjetos de thermanox, y las células deberían permanecer embebidas en el bloque de resina. Con una lupa de trabajo, observar que la célula recuadrada está en el bloque (Fig. M19).

Asegurar que no queda ningún resto de plástico procedente del cubreobjetos en el bloque, porque puede dañar la cuchilla de diamante usada posteriormente en el microtomo.

t) A partir de este punto, el procesado de las muestras se realiza en la Unidad de Microscopía Electrónica de los Servicios Científicos-Técnicos de la Universidad de Barcelona. La captura de las imágenes en el Microscopio Electrónico la realizamos nosotros mismos. El microscopio es un modelo Jeol 1010.



**Figura M19. Célula embebida en el bloque de resina polimerizada.** La célula encuadrada (flecha), es la neurona registrada, y se descarta el resto de microcultivos del cubreobjetos. Tras la sustracción del cubreobjetos de thermanox en nitrógeno líquido, está lista para ser procesada para el microscopio electrónico.

## 5. PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS (VIH-1) DE ALTO TÍTULO MEDIANTE TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK-293T.

El vector pseudotipado VSV-G es la mejor elección para la mayoría de los experimentos de producción de lentivirus, tanto *in vivo* como *in vitro*. Nos basamos en el protocolo usado en el laboratorio de Didier Trono (Lausanne, Suiza).

La producción de lentivirus es la herramienta para modificar genéticamente nuestros microcultivos para que puedan expresar aquellas proteínas que nos interesan estudiar y/o disminuir la expresión de otras, esto es *knockdown* término anglosajón con el que me referiré a partir de ahora.

Estos virus son de segunda generación y únicamente necesitan de dos vectores constitutivos, posteriormente explicados, y el vector con el/los gen/es de interés. La producción de cada tipo de virus se hace mediante la transfección de células de la línea HEK-293T (cultivo explicado en el apartado 1.2 de materiales y métodos). El protocolo está ajustado para comenzar con cinco placas de cultivo de 15 cm de diámetro de células HEK-293T en una confluencia del 80 %, ya que esta proporción es la que da mayor eficiencia. En el caso de necesitar más placas, se recomienda hacerlo en múltiplos de 5, de la forma que el resto de soluciones y componentes.

### 5.1. Material.

#### Equipamiento:

- Campana de flujo laminar de bioseguridad II con luz UV para esterilizar
- Incubador a 37° C y 5 % CO<sub>2</sub>. Uso exclusivo para material vírico
- 5 placas de cultivo de 15 cm de diámetro estériles (TPP, Suiza)
- Tubos de centrifuga cónicos de 15 y 50 ml estériles
- Filtros de 0.22 µm de tamaño de poro estériles (ref. 99250, TPP, Suiza)
- Pipeta *Pasteur* de vidrio
- Pipeta electrónica *Pipetor*
- Frascos de cultivo de 100 ml estériles
- Células HEK-293T (ATCC cat. no. SD-3515)

#### Soluciones:

- Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) con FBS 10% y P/S 1%
- Tripsina/EDTA 0.05% (Invitrogen)
- Tampón Tris-EDTA (TE) pH 8.0. Stock 1x (ver apartado soluciones)
- Agua tamponada (ver apartado soluciones)
- CaCl<sub>2</sub> 2.5 M (ver apartado soluciones)
- Solución salina tamponada con HEPES (HeBS) 2x (ver apartado soluciones)
- Etanol 75 % (v/v) en frasco difusor

- Lejía, en el matraz de los restos del aspirado

Plásmidos:

- pMD2G (contiene el gen de la proteína que forma la cápsula del virus VSV G) (Addgene plasmid 12259)
- pCMVR8.74 (contiene los genes de las proteínas HIV-1 Gag, Pol, Tat y Rev) (Addgene plasmid 22036)
- El plásmido-vector de transferencia con el gen de interés (pInterés). Los plásmidos fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. Steve Royle (Universidad de Warwick, Inglaterra) y fueron utilizados en trabajos previos (Royle et al. 2005). Los plásmidos usados en esta tesis para generar diferentes virus, son los siguientes:

a. pLVTHM-shCHC1. Se utiliza el plásmido pLVTHM (*Addgene plasmid 12247*) con la secuencia pBrain-SpH-shCHC1 (CHC de rata) insertada entre los sitios de corte EcoRI-ClaI. La secuencia pBrain-SpH-shCHC1 se transcribe en un *shRNAi* (*short hairpin RNA interference*), que interferirá con el ARNm de la proteína *Clathrin heavy chain* (CHC) (cadena pesada de clatrina) de rata, reduciendo la expresión de la proteína codificada. Este plásmido también codifica para la sinaptofluorina (SpH) que es un marcador de fluorescencia dependiente de pH y será el indicador de infección.

b. pLVTHM-GL2. Se utiliza el plásmido pLVTHM con la secuencia pBrain-SpH-GL2 (control) insertada en los sitios de corte EcoRI-ClaI. Es un plásmido control que codifica también para SpH.

c. pWPT-EGFP. Se utiliza el plásmido pWPT (*Addgene plasmid 12255*) con la secuencia EGFP. Es un plásmido control. También puede utilizarse el plásmido-vector pWPTXL.

d. pWPT-GFP-nLCa. Se utiliza el plásmido pWPT-GFP donde se clonó la secuencia GFP-nLCa reemplazándola por la EGFP, en los sitios de corte MluI y Sall. nLCa (*neuronal Clathrin light chain a*) es la isoforma neuronal de la cadena ligera de clatrina.

e. Otros plásmidos vectores se utilizaron durante esta tesis pero no se emplearon para los resultados sólidos de ella. Estos son los siguientes: pFCK(1.3)-syphy-GFP (codifica para la proteína sinaptofisina unida a la proteína fluorescente GFP) , pLVTHM-shCHC4 (genera bajada en la expresión de la proteína CHC

humana), pLVTHM-shStonin2 (genera reducción en la expresión de la proteína estonina 2).

### Precauciones:

Este protocolo requiere que los tubos abiertos que contienen material vírico siempre sean manipulados dentro de la campana de flujo laminar. Solamente pueden ser extraídos de la campana cuando éstos están cerrados y pulverizados con etanol al 75 % (v/v). Los restos sólidos y material plástico salen de la campana de flujo con etanol y se depositan en un contenedor azul indicativo de material infeccioso. Todo el líquido aspirado debe ir a un matraz relleno de lejía. Cuando la lejía ya no es de color amarillo, el líquido del matraz debe ser transferido a un recipiente de plástico, perfectamente cerrado y depositado en un contenedor azul, como material muy infeccioso. La campana de flujo debe ser limpiada con etanol 75 % en cada uso durante varias veces. La utilización de doble guante es aconsejable. Y la bata, exclusiva para el manejo de material vírico, debe ser lavada y autoclavada regularmente. Se aconseja utilizar una sala especial para la producción de lentivirus, y un incubador específico para material vírico.

## **5.2. Procedimiento.**

### 1er día:

a) Se plantan aproximadamente  $11 \cdot 10^6$  células HEK-293T / placa de 15 cm diámetro, el día antes de la transfección. Se mantienen en un incubador a 37° C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Idealmente las células deben estar al 80 % de confluencia el día de la transfección. El medio de cultivo es DMEM al 10 % FBS y 1 % de P/S.

No usar células HEK-293T que están en cultivo más de 30 pases.

### 2do día:

b) Dos o tres horas antes de la transfección, se reemplaza el medio de cultivo y se hacen tres lavados con PBS 1x para quitar todo resto del medio anterior que contenía antibiótico.

c) Se reemplaza por 22.5 mL / placa de 15 cm de diámetro, de DMEM al 10 % FBS sin antibiótico

d) En un tubo de 50 mL, se ajusta la concentración de ADN de todos los plásmidos: pMD2G, pInterés, pCMVR8.74 a 1 mg/mL en tampón TE, pH 8.0. Esto es:

Preparar 3.3 mL de TE 0.1X y 1.75 mL de agua tamponada

112.5  $\mu\text{g}$  pInterés

39.5  $\mu\text{g}$  pMD2G

73  $\mu\text{g}$  pCMVR8.74

e) Añadir a este tubo con los plásmidos, 565  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  2.5 M y mezclar muy bien pipeteando o mediante un agitador. A este tubo lo llamaremos Tubo A.

f) En un tubo de 50 mL colocamos 5.7 mL de HeBS 2X. A este tubo lo llamaremos Tubo B.

g) Adaptamos la pipeta *Pasteur* de vidrio a la pipeta electrónica *Pipetor* y emitimos presión positiva (expulsamos aire) dentro de la solución de HeBS del Tubo B, generando un burbujeo constante.

h) Mientras se burbujea vigorosamente la solución del Tubo B, con una pipeta de 1 mL se va depositando gota a gota, el *mix* del Tubo A sobre el Tubo B.

El movimiento vigoroso indicado en los pasos g) y h) favorecerá la formación de un fino precipitado óptimo para la transfección posterior.

i) Una vez pipeteada, gota a gota, toda la solución del Tubo A sobre el B, se deja el precipitado a temperatura ambiente, dentro de la campana de flujo laminar, cerrado, al menos 5 minutos pero no exceder de 30 minutos.

j) Añadir gota a gota 2.25 mL del precipitado / placa de 15 cm de diámetro donde están las HEK-293T. Cada gota sobre el medio de cultivo generará un color blanco. Mover en forma de cruz la placa mientras se van añadiendo las gotas por toda la superficie, hasta que el medio recupere un color rojo uniforme.

k) Incubar las placas toda la noche a 37° C y 5 %  $\text{CO}_2$  en un incubador específico para el uso de material infectado.

### 3er día:

l) Temprano, aspirar el medio de las placas y añadir lentamente 14 mL de DMEM al 10 % FBS y 1 % P/S fresco / placa de 15 cm de diámetro, precalentado a 37 ° C.

Llevar cuidado en el cambio de medio ya que, en este paso, las células HEK-293T tienen una alta tendencia a desengancharse.

La señal de fluorescencia se puede comprobar en este punto en un microscopio si el plásmido vector con el gen de interés también codifica para una proteína fluorescente (ej. GFP)



La transfección debe realizarse tarde el segundo día, y el medio debe ser cambiado temprano a la mañana siguiente. Es necesario este cambio de medio aproximadamente 16 horas después de la adición del ADN.

m) Incubar 8 horas.

n) Recolectar el medio de cultivo de cada placa de 15 cm de diámetro a un tubo de centrifuga de 50 mL. Cerrar los tubos y pulverizarlos con etanol al 75 % (v/v) antes de sacarlos de la campana de flujo laminar. Mantener estos sobrenadantes a 4° C.

Añadimos otros 14 mL de medio DMEM al 10 % de FBS y 1 % de P/S, precalentado a 37° C, a cada placa e incubar durante otras 8-12 horas y tras este período recolectar los sobrenadantes de las placas y pasarlos a tubos de 50 mL.

El sobrenadante puede ser recolectado 2 o 3 veces, cada 8-12 horas. Mantenerlos conservados a 4° C mientras dure el período de recogida.

#### 4° día:

o) Al finalizar las recogidas de los medios, los tubos con los volúmenes perfectamente calibrados, se centrifugan durante 5 minutos a 500 x g (~1800 r.p.m.) y a 4° C para sedimentar restos celulares y desechos.

Una vez centrifugados, los sobrenadantes son recolectados y se desechan los sedimentos.

p) Se filtran los sobrenadantes recolectados y centrifugados usando filtros de un calibre de 0.22 µm de unidad de poro.

El filtrado puede ser conservado a 4° C durante 5-7 días, no más tiempo.\*

q) Se alícuota el filtrado resultante en tubos *ependorf* en cantidades de 1 mL, y se conserva a -80° C.

Los ciclos de congelado/descongelado reducen fuertemente el título de las soluciones víricas. Por lo tanto se aconseja usarlas cada vez que se descongele una alícuota y el resto sobrante, se desecha, en un contenedor de material infeccioso.

\* Los sobrenadantes resultantes de la centrifugación y del filtrado pueden ser concentrados y de esta manera, calcular el título real de la solución vírica, M.O.I (del inglés *Multiplicity of infection*), que corresponde al número de agentes infecciosos, virus, que son necesarios para infectar un número de células, dianas del virus, en una placa. Así, se reduce la variabilidad y se ajusta a un nivel infección reproducible cada vez que se realice el experimento.

En el desarrollo de esta tesis no fue necesario. Las soluciones víricas se aplicaron sin concentrar. El factor variabilidad fue clave en nuestros resultados, puesto que nos permitió establecer una escala de 0 a 100 % en la expresión del fenotipo requerido con la infección, y observar los efectos a cada valor de la escala.

## **6. INFECCIÓN CON LENTIVIRUS DE MICROCULTIVOS DE NEURONAS.**

Todos los lentivirus utilizados codifican para la expresión de una proteína fluorescente asegurando así que los microcultivos han resultado infectados (control de infección).

Las neuronas se infectan cuando están 4-6 DIV. Se utiliza esta fecha ya que la fluorescencia como control de infección se observa con cierto nivel de expresión aproximadamente 5-6 días después. Puesto que las neuronas son registradas entre los días 14-19 DIV nos aseguramos encontrar, durante estos días, el fenotipo deseado. La puesta a punto en el laboratorio de este protocolo de infección sobre microcultivos de neuronas, se determinó después de numerosas pruebas para averiguar el mayor nivel de expresión o reducción de proteína, según el caso. Aún reproduciendo las mismas condiciones, observamos variabilidad tanto entre los diferentes cultivos infectados, como en un mismo cultivo y un mismo pocillo. Las neuronas ofrecieron diferentes valores de infección, lo cual fue determinante en nuestros resultados para observar el fenotipo en función de los diferentes niveles de expresión de la/s proteína/s estudiada/s y poder establecer relaciones significativas.

En cada tanda de infección, en algunos pocillos las neuronas se infectan con virus control (GFP sólo) y a otros pocillos se les añade virus que, además de expresar la proteína fluorescente como control de infección, codifican para la sobreexpresión o reducción de la proteína a estudiar y, así, analizar su efecto. Los valores de la proteína de estudio se determinaron por IF de las células infectadas (con virus controles y virus problema) y registradas, y se hicieron relativos al valor promedio obtenido en las neuronas infectadas con virus control.

El proceso de infección se lleva a cabo con las mismas medidas de seguridad explicadas en el protocolo de producción de lentivirus.

## 6.1. Procedimiento.

### 1er día:

a) Las soluciones que contienen los lentivirus están alicuotadas y conservadas a  $-80^{\circ}$  C. Se utiliza 1 alícuota de 1 mL de solución vírica de alto título por cada dos pocillos de una placa de cultivo, de doce, de neuronas. Así, se extraen del congelador a  $-80^{\circ}$  C las alícuotas de lentivirus necesarias y se dejan descongelar pausadamente dentro de la campana de flujo laminar.

b) Los microcultivos de neuronas se encuentran sembrados en placas de cultivos de 12 pocillos. Cada pocillo contiene 1 mL de medio de cultivo. Cuando las alícuotas de los virus están cuasi descongeladas, se extrae 0.5 mL de medio de cultivo de cada pocillo de la placa de las neuronas. A continuación, se coloca 0.5 mL de solución conteniente del lentivirus requerido a cada pocillo de neuronas.

c) La placa con las neuronas y los virus se coloca en un incubador, específico para el manejo de material infectado, a  $37^{\circ}$  C y 8 % de  $\text{CO}_2$  durante toda la noche.

### 2do día:

d) A la mañana siguiente, se aspira el medio de cada pocillo infectado y se reemplaza por medio de cultivo fresco para las neuronas (ver medio de cultivo en apartado 1 de materiales y métodos).

e) Una vez reemplazado el medio de infección por medio fresco de cultivo, la placa de neuronas puede ser incubada con normalidad en un incubador adecuado para cultivos primarios (ver apartado 1 de materiales y métodos).

## 7. MANIPULACIÓN DE RENACUAJOS DE *Xenopus tropicalis* COMO MODELO *IN VIVO*.

En el laboratorio se trabaja con el modelo animal *Xenopus tropicalis* para hacer experimentos *in vivo*. Después de los resultados obtenidos en los cultivos autápticos, se decidió probar la inyección de los péptidos homólogos a diferentes secuencias de la proteína SPARC en la cola de los *Xenopus tropicalis* en su fase de renacuajo (estadío 45-60) antes de la metamorfosis a rana.

### 7.1. Material y procedimiento.

#### Equipamiento:

- Micropipetas de inyección, con punta modificada. Resistencia 15-20 M $\Omega$
- Soporte (*holder*) para la micropipeta asociado a un inyector

- Inyector *Picospritzer III (Parker)* configurado para que cada pulso de inyección sea de una presión de 30 psi\* y 20  $\mu$ s de duración.
- Botes de muestras de 150 mL (ref. 4098, Reysan)
- Espátula de laboratorio cuchara-pala
- 3 peceras (2.5 litros, 22.7 x 14.7 x 14 cm, Nettuno)
- Placa de cultivo de 6 pocillos
- Lupa Leica M50
- Cámara de imágenes y vídeo acoplada a la lupa *AxioCam MRc5*
- PC y programa Zen lite 2012, Zeiss
- Renacuajos de *Xenopus tropicalis* de 18-22 días *in vivo*

\* 1psi=  $6.894 \cdot 10^3 \text{ N/m}^2 = 6.894 \cdot 10^3 \text{ Pa}$

#### Soluciones:

- Agua preparada con 40 % (g/v) de *Instant ocean Aquarium Sea Salt mixture*, 700  $\mu$ S y pH 8.1
- Solución de inyección de *Xenopus tropicalis* (ver Anexo soluciones)
- Tricaína 0.02 % en agua bidestilada, para anestesiar *Xenopus tropicalis*
- Péptido 2.1 (péptido con dominio folistatin), stock 1.90 mM. Solución de inyección a 500  $\mu$ M del péptido
- Péptido 4.2 (péptido con dominio *EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding*), stock 1.8 mM. Solución de inyección a 500  $\mu$ M del péptido
- Colorante *Lucifer Yellow* 0.5 mM en agua bi-destilada
- Solución de fijación en paraformaldehído al 4 % en PB 0.1 M

#### Procedimiento:

a) Se prepara el material. Se rellenan tres peceras con el agua correspondiente, cada una para una condición: animales sin inyectar, inyectados con péptido 2.1 e inyectados con péptidos 4.2.

b) Se calibran las pipetas de microinyección, para inyectar siempre la misma cantidad. Para ello se pone dentro de la pipeta 1  $\mu$ L de solución de inyección sola y, ajustando el inyector para que en cada pulso se ejerza una presión de 30 psi en 20  $\mu$ s de duración, se calculan cuántos pulsos son necesarios para expulsar totalmente el  $\mu$ L. De esta manera, sabremos qué volumen contiene cada gota generada por el pulso de presión. Se consideran óptimas las pipetas que con cada pulso, generan gotas de 20-40 nL, esto es, una resistencia de 15-20 M $\Omega$ .

c) Se preparan sendas soluciones de inyección con los péptidos a 500  $\mu\text{M}$  respectivamente. Se conservan en hielo para que el péptido no se degrade.

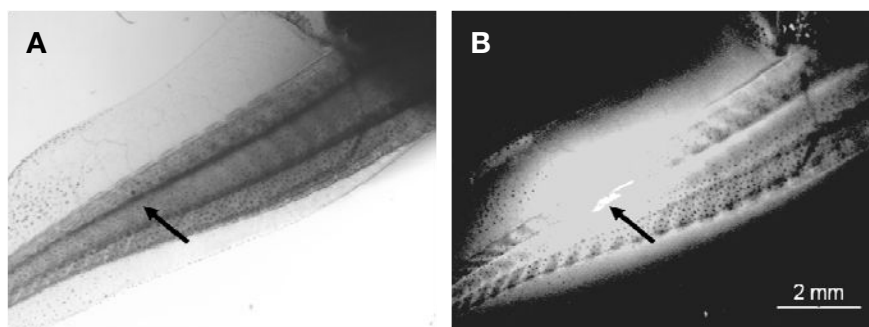
Las primeras pruebas de inyección se hicieron con el colorante Lucifer Yellow, para ver la difusión de la solución dentro del volumen de la cola, además de asegurarnos de inyectar en la zona de somitas y siempre hacerlo en el mismo lugar (Fig. M20).

Asumiendo que a  $\sim 12$  días *in vivo* los renacuajos de *Xenopus tropicalis* tienen las dimensiones de cola de: 4 mm de anchura en su parte más gruesa y 15 mm de longitud aproximada, se aplica la fórmula del volumen de un cono  $V = \pi r^2 h / 3$ , resultando en un volumen de  $\sim 16 \mu\text{L}$ . De esta manera, tras numerosas pruebas se decidió inyectar un  $\sim 4\%$  del volumen de la cola, esto es, 600 nL de solución de inyección con el péptido correspondiente a concentración 500  $\mu\text{M}$ , para que difundiera a lo largo de toda ella sin causar edemas que alteraran el experimento y su resultado. Esto resultaría en una concentración homogénea final de los péptidos de 20  $\mu\text{M}$  en cada punto de la cola.

De esta manera se cargan las pipetas de microinyección y se colocan en el soporte asociado a un inyector.

d) Se anestesian los animales en triclaína 0.02% durante 5 minutos. El anestésico está dentro de un bote de muestras de 150 mL.

e) Se colocan los animales anestesiados uno a uno bajo la lupa y, con la pipeta de microinyección cargada con la solución con el péptido correspondiente, se va inyectando a cada renacuajo la cantidad de 600 nL, ejerciendo la cantidad de pulsos necesarios en función de la calibración de la pipeta y el volumen de cada gota/pulso. La zona de inyección es dentro del músculo a mitad de la cola, para que exista una difusión homogénea en todas direcciones (Fig. M20).



**Figura M20. Cola de renacuajo de *Xenopus tropicalis* microinyectada.** A) Imagen de luz transmitida bajo lupa de una cola de animal que ha sido inyectada con 600 nL de solución que contiene el colorante Lucifer Yellow. La inyección se realiza a mitad de la cola en el músculo (flecha). B) Imagen de campo amplio, con luz UV, en la que se observa foco del máxima señal del colorante Lucifer Yellow (flecha), que corresponde al lugar donde se ha inyectado, y la difusión a lo largo de la cola.

f) Una vez inyectados, se colocan en una pecera con agua preparada, y progresivamente se van despertando. Una vez despiertos, se toman grabaciones de vídeo, incluyendo tanto tomas generales de la población de animales de cada condición para el estudio de su movilidad, como del movimiento individualizado de la cola de cada uno de ellos, bajo la lupa y con la cámara *AxioCam MRc5*, todo ello a los tiempos requeridos (explicado en los resultados de esta tesis).

g) Una vez hechas las grabaciones los animales son fijados en solución de paraformaldehído al 4 % y se conservan a 4° C hasta realizar los experimentos requeridos: inmunofluorescencia y análisis de imágenes.

h) Para realizar la inmunofluorescencia de las colas de los renacuajos inyectados y fijados a los diferentes tiempos, se separa del resto del cuerpo con unas tijeras *Superfine Vannas* de punta recta 8 cm de largo, cortando justamente caudal al estómago del animal, donde comienza la médula espinal.

## 7.2. PROCESADO DE VÍDEOS Y ANÁLISIS CUANTITATIVO.

El vídeo grupal de los animales de cada condición se realizó con una cámara de fotos compacta durante 2 minutos. El procesado de las secuencias de imágenes de vídeo se llevó a cabo con ImageJ, estableciendo como fondo la pecera y detectando por contraste a los animales. De esta manera se pudo analizar la trayectoria del movimiento de los animales.

El registro de imágenes del movimiento de las colas de los renacuajos se llevó a cabo con una cámara *AxioCam MRc5* acoplada a la lupa de observación (*Leica M50*) y el programa Zen lite 2012, Zeiss. Se tomaron 1000 imágenes, una cada 5 ms con un factor de agrupación (*bin*) de 8 x 8 en blanco y negro. El procesado de éstas consistió en el cálculo de la frecuencia del movimiento de la cola. Puesto que la cola presenta una curvatura durante el movimiento, se eligieron puntos de la región de mayor curvatura y se calculó la frecuencia a la que dichos puntos regresaban a la posición inicial. Se compararon entre las diferentes condiciones.

## 8. INMUNOFLUORESCENCIA DE COLAS DE *Xenopus tropicalis*.

Todos los pasos del protocolo se hacen en agitación suave y la duración es de tres días. El procedimiento es el siguiente:

1er día:

a) Se extraen las colas de los animales completamente fijados en paraformaldehído al 4 % en PBS y se colocan en una placa de cultivos de 12 pocillos. Es aconsejable poner sólo 1 o 2 colas por pocillo para que haya suficiente espacio para el movimiento de éstas. Se realizan tres lavados de 5 minutos con PBS 1X a temperatura ambiente.

b) Se hace un tratamiento de permeabilización durante 20-30 minutos en una solución al 0.5 % Triton X-100 de PBS a temperatura ambiente.

c) Se hace un segundo tratamiento de permeabilización y bloqueo, colocando las colas en una solución de BSA 2 mg/mL de y Triton X-100 al 0.1 % en PBS (solución a la que llamamos P-B-T), durante 15 minutos.

d) Se lleva a cabo un segundo bloqueo con una solución de BSA 2 mg/mL, Triton X-100 al 0.1 % y NGS al 10 % en PBS, durante 3-4 horas.

e) El anticuerpo primario se coloca en una solución similar a la del paso d) y se deja toda la noche a 4° C.

2do día:

f) Se realizan cinco lavados de 1 hora cada uno, con solución P-B-T.

g) El anticuerpo secundario se coloca en una solución similar a la del paso d) y se deja toda la noche a 4° C.

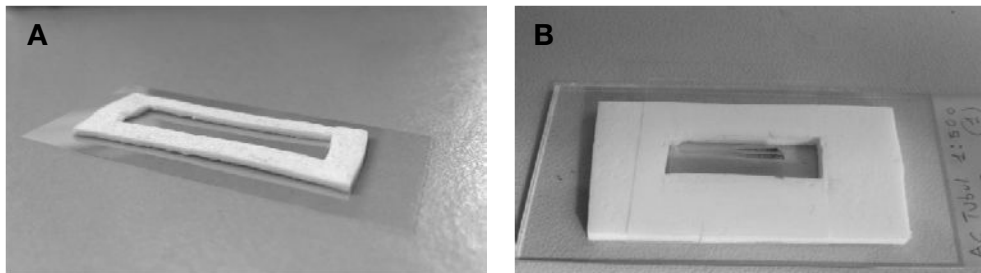
3er día:

h) Se realizan cinco lavados de 1 hora cada uno, con solución P-B-T.

i) El montaje se realiza con medio Mowiol. El procedimiento es el siguiente (figura M21):

- Utilizamos una cinta de montaje adhesiva por ambas caras, de 2 cm de ancha y 1.5 mm de gruesa, para generar una cámara de ese mismo espesor. Cortamos un trozo de aproximadamente 3-4 cm de largo (Ceys).
- Con un bisturí realizamos un rectángulo en su interior de 2 x 0.5 cm.
- Adherimos una de las caras del rectángulo resultante a un cubreobjetos de 24 x 50 mm (Menzel-Gläser), generándose una cámara hueca.
- Con una pipeta de 1 mL, añadimos una pequeña cantidad de Mowiol sobre dicha cámara.
- Colocamos la cola de *Xenopus tropicalis* extendida dentro de esa cámara y con el eje dorso-ventral sobre el ancho de la cámara.

- Rellenamos la cámara con Mowiol hasta observar que rebosa de ésta, evitando burbujas.
- Colocamos un portaobjetos sobre el resto del montaje, evitando la aparición de burbujas o cámaras de aire.
- Se deja en ausencia de luz durante toda la noche. Después se coloca a 4° C para conservar hasta uso.



**Figura M21. Montaje de las colas de *Xenopus tropicalis*.** A) Camarita creada entre el cubreobjetos y la cinta de montaje adhesiva. B) Montaje resultante de una colas de renacuajo de *X. tropicalis*.

La IF sobre las colas de *Xenopus tropicalis* nos permite estudiar las uniones neuromusculares en este modelo tras la aplicación de diferentes tratamientos explicados en el apartado de resultados. Para ello, se utilizan diferentes anticuerpos:

Anticuerpo primario	Origen	Concentración	Referencia
Anti-Tubulina acetilada (monoclonal)	Ratón	1:500	Sigma (T7451)
Anti-Sinaptofisina (policlonal)	Conejo	1:500	Synaptic System (101002)
Faloidina-atto 488	-----	1:500 (stock 0.1 mM)	Sigma (49409)

**Tabla M7. Anticuerpos de uso en la cola del renacuajo de *X.tropicalis*.**

Los anticuerpos secundarios están marcados por fluoróforos AlexaFluor 488 y AlexaFluor 555 y son usados a concentraciones 1:500. Para la identificación de uniones neuromusculares, las muestras se observan en:

- Microscopio de campo amplio Zeiss, modelo Axio Examiner.A1, acoplado a una cámara AxioCam MRc5 y se usa el *software* AxioVision 4.7 para adquirir las imágenes.
- Microscopio Confocal Espectral Leica TCS-SL y las imágenes se adquieren con el programa Leica Confocal Software (LCS), en los Servicios Científicos Técnicos de la Universidad de Barcelona.
- Microscopio Confocal Espectral de Alta Velocidad y Multifotón Leica TCS-SP5 en los Servicios Científicos Técnicos de la Universidad de Barcelona.

El procesado de todas las imágenes se lleva a cabo con el programa ImageJ.





# RESULTADOS

"Descubrí el secreto del mar meditando sobre una gota  
de rocío"

Antonio Machado



## 1. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LOS CAMBIOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA MADURACIÓN DE LOS TERMINALES PRESINÁPTICOS.

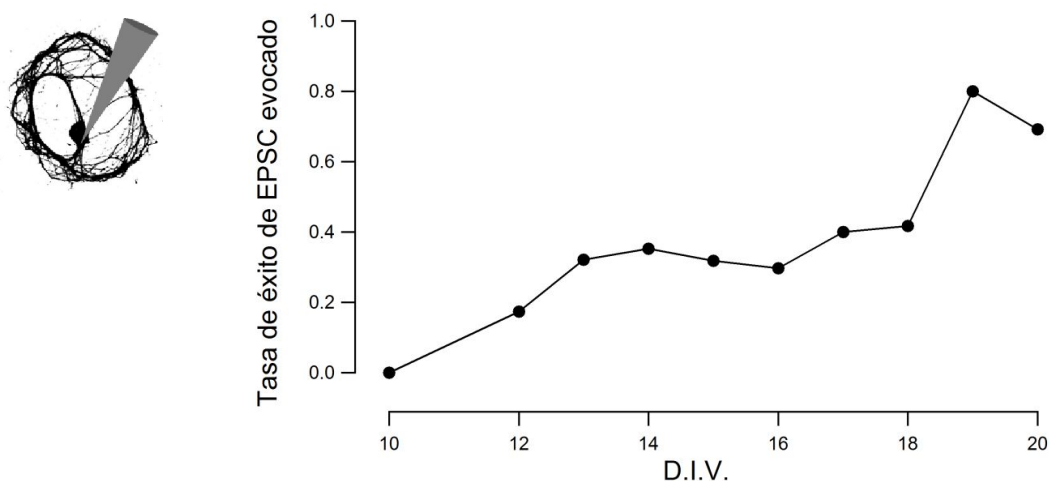
La electrofisiología ha sido la principal herramienta que he usado para el estudio de la neurotransmisión en los SCMs. Todas las neuronas utilizadas a lo largo de esta tesis fueron previamente registradas para conocer si presentaban o no sinapsis funcionales. Así, sólo aquellas que presentaron respuesta autáptica evocada fueron consideradas.

El primer objetivo de esta tesis se basa en el estudio de los cambios funcionales que afectan a la plasticidad a corto plazo durante la maduración sináptica. Para este fin, se consideraron diferentes características.

### 1.1. DESARROLLO DE SINAPSIS FUNCIONALES DURANTE LA MADURACIÓN SINÁPTICA.

Anteriormente en el laboratorio, se había determinado que eran necesarias aproximadamente dos semanas en cultivo para que las neuronas presentasen respuesta evocada tras aplicarles un pulso despolarizante (Perez-Gonzalez et al., 2008).

Mi primera observación fue la variación en la probabilidad para encontrar respuesta sináptica evocada en función de los días en cultivo (n=234 SCMs).



**Figura R1. Tasa de éxito de encontrar un EPSC en función de los D.I.V.** El estudio analiza la respuesta de 234 neuronas entre los días 10 y 20 en cultivo. Por debajo de 12 D.I.V. no se obtiene respuesta sináptica evocada. Por encima de 20 días prácticamente el ~70% de los SCM registrados presentan EPSC.

Como se observa en la figura R1, la tasa de éxito para encontrar respuesta autáptica aumenta durante el desarrollo. Por debajo de 12 D.I.V. nunca se obtuvo un

EPSC y por encima de 19 D.I.V.  $\geq 70\%$  de los SCMs lo presentó. Sin embargo, a partir de 20 días existían dificultades para realizar los registros, ya que las células ofrecían mayor resistencia a establecer un sello entre la membrana y la pipeta de registro, posiblemente por la alta cantidad de proteínas y canales en superficie.

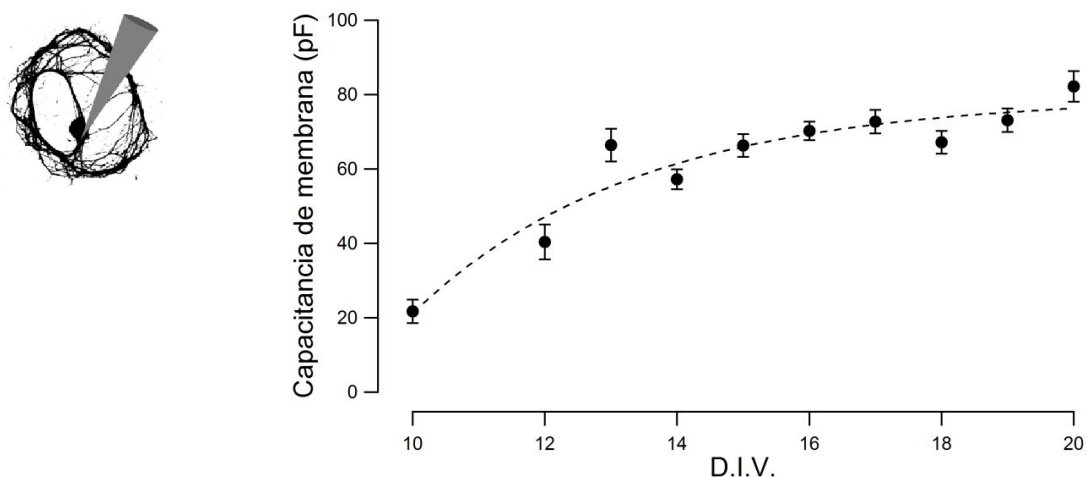
Adicionalmente, se pudo determinar que existían grandes diferencias morfológicas y funcionales entre las neuronas registradas a 12 D.I.V. y a 18-20 D.I.V. Las diferencias radicaron tanto en el valor de la capacitancia de la membrana como en las respuestas evocadas, y permitieron entender el proceso de maduración de las sinapsis, centrándonos en el terminal presináptico.

## 1.2. INCREMENTO DE LA CAPACITANCIA DE LA MEMBRANA CON LA MADURACIÓN SINÁPTICA.

Se observó que el desarrollo de las neuronas *in vitro* era progresivo, produciéndose una elongación de los procesos neuronales tras el momento de la siembra. A partir de los diez días en cultivo algunas neuronas morían, pero se advirtió un engrosamiento de los procesos de las neuronas que progresaron.

Para evaluar las variaciones en el tamaño celular, se midió el valor del transiente capacitativo lento ( $I_c$ ), cuyo valor es proporcional a la superficie neuronal.

Los resultados indicaron un crecimiento exponencial en la capacitancia de la membrana de los SCM registrados, en función de los D.I.V. ( $n=503$  SCMs, 10-20 D.I.V., Fig. R2).

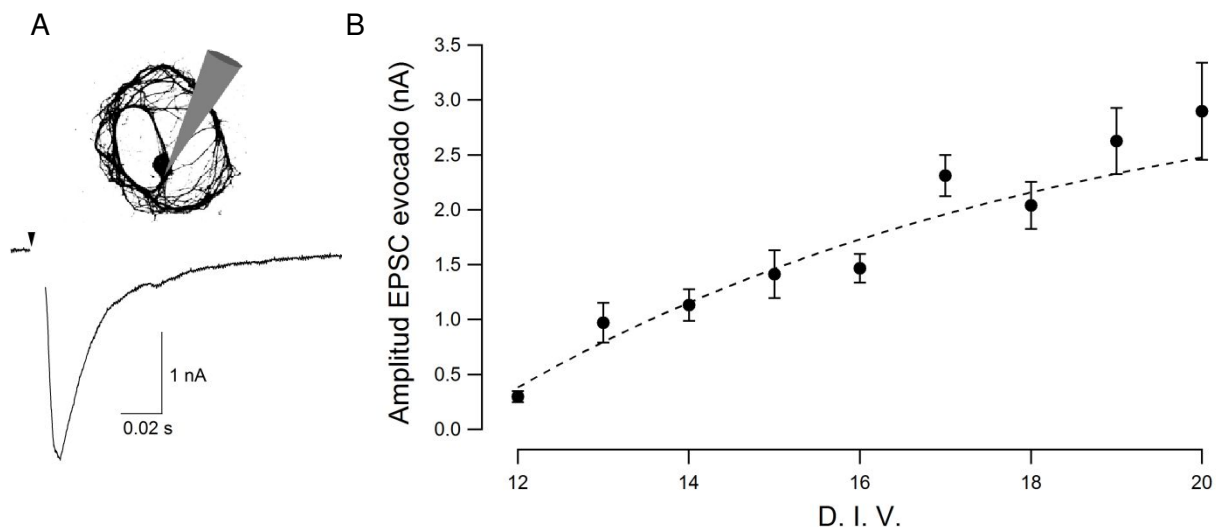


**Figura R2. Cambio de la capacitancia de membrana de los SCMs en función de los días en cultivo.** El estudio cuenta con 503 células y se centra entre los días *in vitro* 10 ( $22 \pm 3$  pF) y 20 ( $79 \pm 3$  pF). Para cada día en cultivo se representa el valor promedio de la capacitancia  $\pm$  error estándar. Los valores promedio se ajustan a una función exponencial simple (línea de puntos) con una constante de tiempo  $\tau=3$  D.I.V.

En el momento en el que comenzaron a aparecer sinapsis funcionales ( $\geq 13$  D.I.V.), el valor de la capacitancia era  $\sim 50$  pF, alcanzando los 80 pF a los 20 D.I.V.

### 1.3. CAMBIOS EN LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EXCITATORIAS EVOCADAS DURANTE LA MADURACIÓN SINÁPTICA.

A continuación se investigaron las características funcionales que presentaban los SCMs durante su desarrollo. En primer lugar se estudió la variación de la amplitud de los EPSCs en función de los D.I.V. ( $n=191$  SCMs, 12-20 D.I.V.). La medida de la amplitud indica el punto de máxima sincronización en la liberación del neurotransmisor por las sinapsis estimuladas, y en consecuencia, la máxima exocitosis de vesículas sinápticas a partir del terminal presináptico (Stevens & Williams, 2007). Bajo una concentración fisiológica extracelular de calcio de 2 mM (Perez-Gonzalez et al., 2008), la variación de la amplitud del EPSC durante el desarrollo se ajustó a una función exponencial simple con una  $\tau \approx 5$  D.I.V. (Fig. R3). A partir del EPSC inicial de  $\sim 1$  nA observado a 14 D.I.V., las corrientes llegaron a superar los 3 nA por encima de los 18 días en cultivo.



**Figura R3. Variación en la amplitud del EPSC evocado con los D.I.V.** A) Aspecto característico de un EPSC registrado en un SCM. La cabeza de flecha indica la aplicación del estímulo. B) El valor promedio de la amplitud del EPSC de todos los SCMs registrados  $\pm$  error estándar ( $n=191$  SCMs) se representa en función de los días en cultivo. La línea de puntos indica el ajuste de una función exponencial simple con  $\tau=5$  D.I.V.

Para entender las causas de los cambios en la amplitud del EPSC durante el desarrollo nos planteamos cuáles podían ser los parámetros más susceptibles de ser afectados. Se considera que el valor del EPSC se puede calcular a partir de la siguiente expresión (Silver et al., 1998):

$$I_{EPSC} = N \cdot q \cdot Pr,$$

donde  $N$  es el número de sitios de liberación independientes (~sinapsis individuales para el caso de los SCMs),  $q$  es la carga cuantal o corriente generada por la liberación de una sola vesícula, y  $Pr$  es la probabilidad de liberación. A partir de nuestros estudios previos, sabíamos que la mayoría de sinapsis se establecen durante las primeras dos semanas en cultivo y se mantienen (Albrecht et al., 2012), y el parámetro  $q$  muestra poca variabilidad durante el desarrollo (Perez-Gonzalez et al., 2008). Consecuentemente,  $Pr$  era el factor más susceptible de influenciar los cambios en las corrientes evocadas, tal y como se ha sugerido para otros tipos de neuronas (Silver et al., 1996), y se ha descrito durante la maduración sináptica (Feldmeyer & Radnikow, 2009).

#### **1.4. CAMBIOS EN LA PLASTICIDAD A CORTO PLAZO DURANTE LA MADURACIÓN SINÁPTICA.**

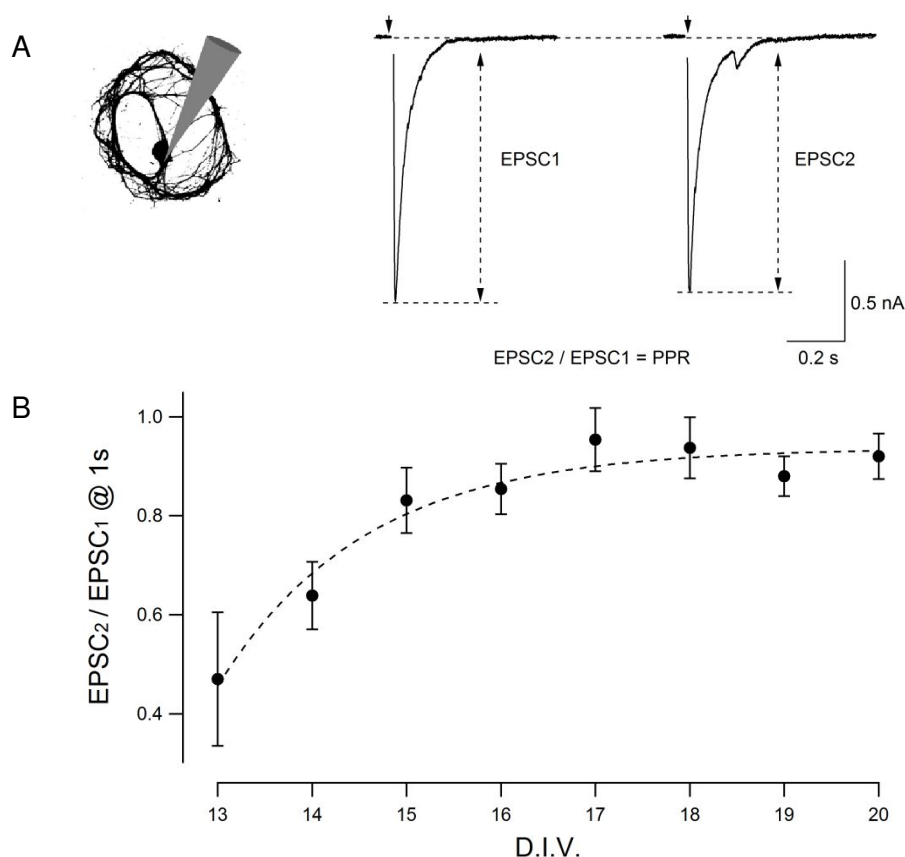
La  $Pr$  es un valor sujeto a una alta variabilidad. Por ejemplo, para un mismo cultivo autáptico las  $Pr$  de las sinapsis que lo forman se encuentran distribuidas bajo una función beta (Murthy et al., 1997), es decir, un comportamiento no contemplado bajo una distribución normal. Las oscilaciones en la  $Pr$  son necesarias para que las sinapsis ejerzan un correcto procesado de la información. Además, la  $Pr$  es un factor clave de la plasticidad sináptica a corto término (Zucker & Regehr, 2002), afectando a la respuesta de las sinapsis cuando son estimuladas con frecuencias variables de potenciales de acción. Para evaluar cómo la  $Pr$  y en consecuencia la plasticidad sináptica a corto término variaba durante el desarrollo, se utilizaron dos paradigmas de estimulación complementarios: una estimulación mediante pulsos pareados, y trenes de estímulos a alta frecuencia. Ambos protocolos son particularmente apropiados para estudiar cambios a nivel presináptico.

##### **1.4.1. Estudio de los cambios en la plasticidad a corto plazo mediante un protocolo de pulsos pareados.**

El protocolo de pulsos pareados (PPP, *paired pulse protocol*) consiste en aplicar dos pulsos despolarizantes separados por un intervalo de tiempo (Zucker & Regehr, 2002), que en nuestras condiciones osciló entre 50 ms y 2 s. Los cambios plásticos se reflejan en la relación entre la corriente evocada por el segundo

estímulo, EPSC<sub>2</sub>, y la corriente evocada por el primer estímulo, EPSC<sub>1</sub> (PPR, *Paired Pulse Ratio*). Esta relación permite observar la capacidad de respuesta de una sinapsis frente a un segundo estímulo, un corto período de tiempo después de haber sido estimulada. El protocolo fue caracterizado en trabajos previos en el laboratorio en SCMs ya maduros, a diferentes probabilidades de liberación y variando el tiempo de intervalo entre los pulsos pareados (Perez-Gonzalez et al., 2008). El PPR calculado a diferentes intervalos de tiempo en neuronas registradas a  $[Ca^{+2}]_{ext}=2$  mM, se ajustó a una función exponencial simple con una constante de tiempo de  $\sim 0.5$  s. Por lo tanto, para un intervalo de 1 s, la PPR  $\sim 1$ .

Cuando se estudió la PPR a 1 s durante la maduración, se observó cómo los SCMs más inmaduros mostraban valores claramente depresivos (Fig. R4). La PPR aumentó en función de los D.I.V. siguiendo una función exponencial, alcanzándose un *ratio* de  $\geq 0.9$  por encima de 17 D.I.V. A partir de 20 días, la probabilidad de encontrar depresión era casi nula y en algunos casos existía incluso facilitación.



**Figura R4. Relación de los pulsos pareados a 1 s con los D.I.V.** A) Protocolo de pulsos pareados. La depresión se alcanza con  $PPR < 1$ , y la facilitación con  $PPR > 1$ . B) PPR a 1 s vs D.I.V. El estudio cuenta con 107 células registradas entre los días 13 y 20 *in vitro*. Se representa, para cada día en cultivo, el valor promedio del  $PPR \pm$  error estándar. Los valores promedio para cada día se ajustan a una función exponencial simple (línea de puntos) con una constante de tiempo  $\tau=2$  D.I.V.



Como se ha explicado en la introducción, durante la maduración sináptica ocurren numerosos cambios que pueden ser la base del incremento de la PPR con el desarrollo. El paso de una sinapsis depresora a facilitadora refleja muy probablemente una disminución de la Pr tal y como se ha descrito en otras sinapsis (Feldmeyer & Radnikow, 2009). Considerando que un aumento del tamaño del RRP podría participar en la reducción de la Pr, decidimos investigar esta posibilidad.

#### **1.4.2. Implicación del RRP en los cambios de la plasticidad a corto plazo.**

En condiciones de 2 mM de  $[Ca^{+2}]_{ext}$ , la aplicación de un tren de estímulos a alta frecuencia genera la depresión de las respuestas postsinápticas. Teniendo en cuenta que las fibras preganglionares que inervan el SCG disparan a una frecuencia máxima de 10-40 Hz (Birks & Isacoff, 1988; Huang, Yu, & Cohen, 2000), se eligió una estimulación a 14 Hz para hacer un análisis de la plasticidad sináptica (Stevens & Williams, 2007), y estimar el tamaño del RRP (Schneeggenburger et al., 1999).

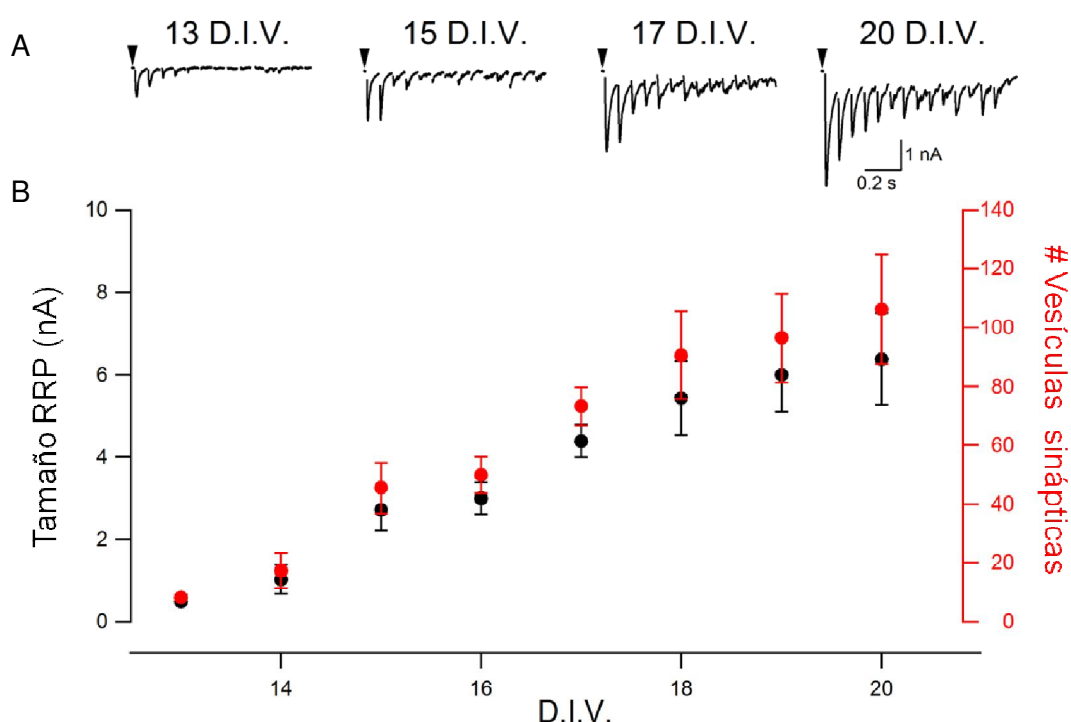
El tamaño del RRP creció de forma progresiva con la maduración (Fig. R5B). Las neuronas con 13 D.I.V. presentaron un tamaño promedio del RRP  $<1$  nA, y alcanzaron  $\geq 6$  nA a partir de 19 D.I.V. Considerando que la  $q$  es de  $\sim 60$  pA (Perez-Gonzalez et al., 2008), en el total de los terminales estimulados de una misma neurona a los 13 D.I.V. se liberarían  $\sim 8$  vesículas sinápticas, frente a  $>100$  a partir de los 19 D.I.V.

El incremento del RRP durante la maduración sináptica supondría dos posibilidades que pueden sumarse: *i)* un aumento del número de contactos axosomáticos funcionales, y/o *ii)* un mayor número de vesículas asociadas a las zonas activas de cada terminal presináptico. Considerando que existe un número de contactos sinápticos funcionales parecido durante la maduración en este modelo *in vitro* (Furshpan et al., 1986; Albrecht et al., 2012), el cambio observado residiría mayoritariamente en el aumento del número de vesículas que forman parte del RRP.

Asumiendo que un cultivo promedio contiene entre 15 y 40 sinapsis a nivel axosomático, y que cada sinapsis presenta una sola zona activa, significaría que en un cultivo inmaduro existen muy pocos terminales funcionales que contendrían 1-2 vesículas por zona activa. En cambio, los terminales maduros presentarían 3-5 vesículas en su densidad presináptica. En conjunto, estas estimaciones son

comparables a datos obtenidos en neuronas hipocampales en cultivo (Mozhayeva et al., 2002; Schikorski & Stevens, 2001).

El enlentecimiento de la cinética de depresión durante la aplicación de trenes de estímulos indicó que en función del desarrollo, además del crecimiento del depósito, existió una disminución de la Pr (Feldmeyer & Radnikow, 2009). A 14 D.I.V., todo el RRP se liberaba con la llegada de los dos primeros estímulos del tren (Fig. R5A, trazos de la izquierda), provocando una marcada depresión y una rápida llegada al estado estacionario. En los terminales maduros, el RRP se liberó gradualmente, obteniéndose una depresión más lenta (Fig. R5A, trazos de la derecha).



**Figura R5. Cambios del tamaño estimado del RRP durante la maduración *in vitro*.** A) Los trazos representan ejemplos individuales de EPSCs evocados por trenes a 14 Hz de células a los días indicados. La cabeza de flecha indica el comienzo de la estimulación. B) Tamaño del RRP y número de vesículas de este depósito en función del desarrollo *in vitro* (n=82). Se representa el valor del RRP, para cada día en cultivo, expresado como corriente o como número de vesículas estimadas  $\pm$  error estándar.

### 1.5. MODELO DE LA MADURACIÓN FUNCIONAL DE LAS SINAPSIS COLINÉRGICAS *IN VITRO*.

Los resultados obtenidos demuestran que las neuronas autápticas colinérgicas establecidas a partir del SCG suponen un buen modelo para el estudio de los procesos de plasticidad *in vitro*, y evidencian que la neurotransmisión está muy

ligada al grado de madurez de las sinapsis. La tabla R1 resume las principales características funcionales durante el desarrollo.

Propiedades	Contactos sinápticos inmaduros (<15 D.I.V.)	Contactos sinápticos maduros (>15 D.I.V.)
Probabilidad de encontrar sinapsis funcionales	≤40%	≥40%
Capacitancia de membrana	≤60 pF	60-100 pF
Características de los EPSCs	Amplitud ≤1.5 nA Generado por pocas sinapsis (~13-20)	Amplitud ≥1.5 nA Generado por un elevado número de sinapsis (~25-40)
PPR a 1s	PPR ≤0.8 Marcada depresión	PPR ~1 Leve depresión o facilitación
Respuesta a la estimulación a alta frecuencia	Rápida llegada a un estado estacionario en la depresión. Vaciamiento del RRP con los primeros potenciales de acción	Lenta llegada a un estado estacionario en la depresión. Progresivo vaciamiento del RRP
Tamaño del RRP	≤2 nA ~8 vesículas sinápticas totales ~1-2 vesículas/zona activa	≥2 nA >100 vesículas sinápticas totales ~5 vesículas/zona activa

**Tabla R1. Características funcionales de los SCMs en función de la madurez sináptica.**

El conjunto de los resultados revela que los SCMs ofrecen una doble ventana de trabajo: *i*) neuronas en las que la mayoría de sinapsis se encuentran en un estado de inmadurez (<15 D.I.V.); y *ii*) neuronas en la que la mayoría de sinapsis son maduras (≥15 D.I.V.).

Como se ha descrito, los cambios observados durante el desarrollo principalmente evidencian un aumento en el tamaño de los depósitos de vesículas que modifica la plasticidad a corto plazo. Debido a que la endocitosis es clave para la formación de las vesículas que rellenan los diferentes reservorios del terminal presináptico (Saheki & De Camilli, 2012), y además es la etapa limitante para mantener el neurotransmisión (Balaji et al., 2008), nuestro siguiente objetivo se centró en conocer cómo este mecanismo afectaba a la plasticidad durante la maduración sináptica. Para estudiar la contribución de la endocitosis mediada por clatrina pusimos a punto aproximaciones experimentales que validamos en SCMs maduros. El volumen y complejidad de los resultados obtenidos impidió realizar el

estudio durante los diferentes estadios de maduración, dejando abierta esta cuestión para el futuro.

## **2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS NIVELES SINÁPTICOS DE CLATRINA EN LA NEUROTRANSMISIÓN.**

Tras la exocitosis el terminal presináptico debe reciclar las vesículas con alta eficacia a fin de preparar los depósitos para un nuevo potencial de acción. Como se ha explicado en la introducción, cuando las neuronas operan a una alta actividad, la depresión afecta a la capacidad de mantener la neurotransmisión, ya que la tasa de exocitosis excede intensamente a la de endocitosis (Fernández-Alfonso & Ryan, 2004). Considerando que el principal mecanismo de reciclaje de las vesículas en el terminal presináptico es la endocitosis mediada por clatrina (CME, Granseth et al., 2006; Royle & Lagnado, 2010), pasamos a abordar una cuestión que se encontraba abierta. Debido a la gran abundancia de clatrina en el citoplasma, se ha considerado que las sinapsis contienen un reservorio ilimitado, necesario para mantener la neurotransmisión. Sin embargo, algunos estudios recientes han sugerido que esta visión podía ser incorrecta (Wilhelm et al., 2014), y que pequeñas variaciones podrían tener un gran efecto sobre la funcionalidad sináptica (Moskowitz et al., 2005). ¿Podía ser que los cambios en el RRP durante el desarrollo estuviesen relacionados con variaciones en la capacidad endocítica de los terminales?

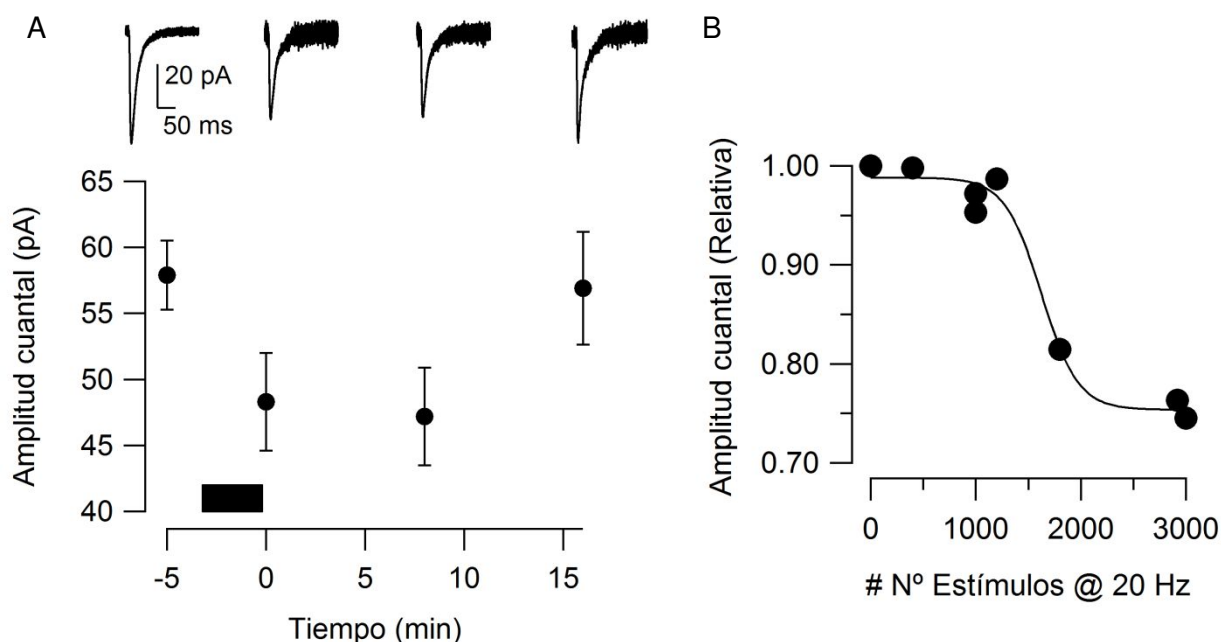
### **2.1. CAMBIOS PLÁSTICOS EN LA NEUROTRANSMISIÓN DE LOS SCMs TRAS PERÍODOS DE ALTA ACTIVIDAD.**

Cuando planteamos el estudio, existía una cierta controversia sobre el comportamiento de clatrina localizada en la sinapsis, durante períodos de alta actividad neuronal. En cultivos masivos de neuronas de hipocampo se habían descrito dos posibles comportamientos. Por un lado la aplicación de 750 estímulos a 20 Hz o de 90 mM de KCl, concentraban a clatrina en los botones presinápticos y reducía su presencia en las regiones perisinápticas (Mueller et al., 2004). Alternativamente, otros autores observaron que 400 estímulos a 20 Hz provocaban la salida del ~4% de clatrina del terminal presináptico, y también de otras proteínas presinápticas como VAMP 2 y sinaptofisina, para concentrarlas en las regiones perisinápticas (Granseth et al., 2006). Independientemente de los resultados

obtenidos, el conjunto de esas observaciones indicaban que los niveles sinápticos de clatrina no son fijos y que varían con la estimulación.

En este contexto se decidió estudiar el comportamiento de la clatrina sináptica durante períodos de alta actividad en los SCMs. Cuando las neuronas maduras (16-20 D.I.V.) se estimularon a 20 Hz, se observó una marcada depresión que afectó al tamaño de la corriente cuantal (Fig. R6) y del RRP (Fig. R7).

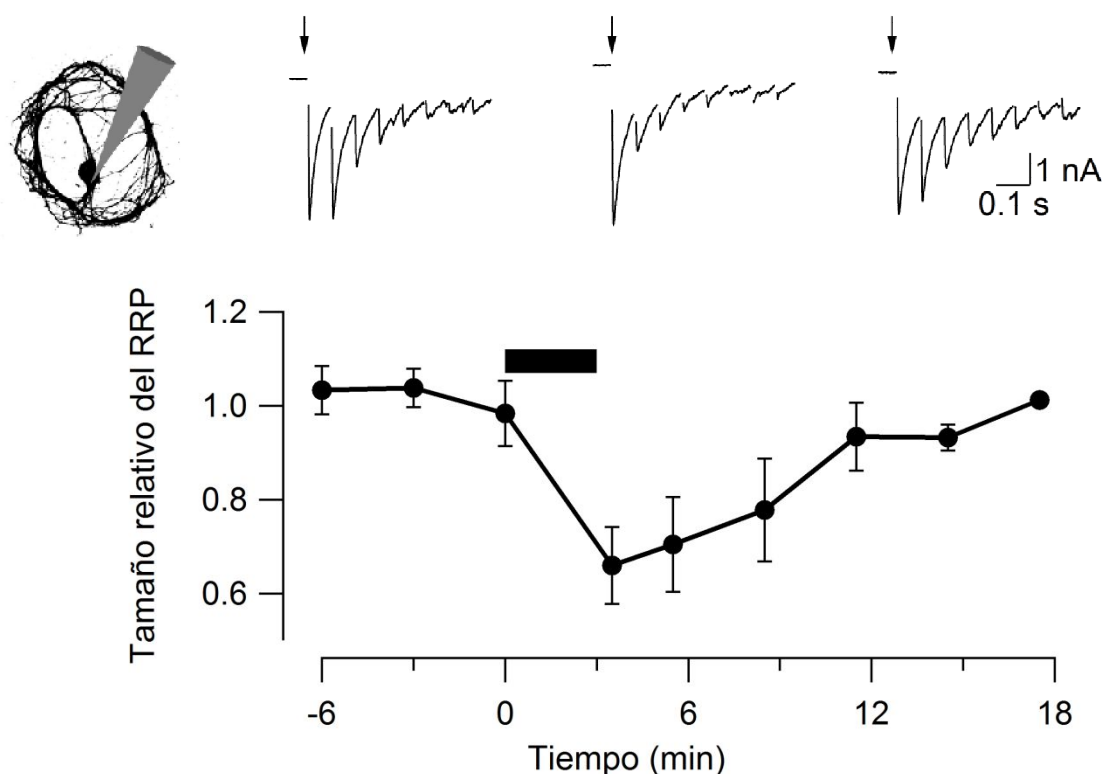
La amplitud de los mEPSCs se redujo ~20% inmediatamente después de una prolongada estimulación (>1 min) a 20 Hz. La recuperación se observó tras ~15 min (Fig. R6A), de modo similar a resultados obtenidos en la NMJ de rana (Naves & Van der Kloot, 2001).



**Figura R6. Depresión transitoria de la carga cuantal tras un período de alta actividad.** A) Arriba se representan los trazos promedios de los mEPSC de una única neurona registrada a los tiempos indicados. La gráfica representa el cambio promedio de la amplitud de la corriente cuantal tras la aplicación de 1600 estímulos a 20 Hz (barra). B) Cambio relativo en la corriente cuantal en función del número de estímulos a 20 Hz. La curva se ajusta a una función sigmoideal, donde la mitad del efecto máximo se alcanza con 1624 estímulos. Cada punto representa un SCM.

Con el fin de precisar el umbral de estimulación requerido para observar la depresión de los mEPSCs, se varió la duración del tren de estímulos a 20 Hz. El registro de la actividad espontánea se realizó 5 min después del final de la estimulación (Fig. R6B), para descartar la liberación asincrónica por acumulación de calcio intracelular. La relación se ajustó a una función sigmoideal, donde por debajo de 1200 estímulos no hubo depresión, pero a partir de este valor el tamaño cuantal se redujo hasta un ~25% cuando se aplicaron 3000 estímulos (figura R6B).

Además del efecto sobre la carga cuantal, el tamaño del RRP se redujo >30% inmediatamente después de una prolongada estimulación tetánica (>2 min) a 20 Hz. De nuevo, no se observó una recuperación hasta ~15 min después (figura R7). La estimación del tamaño del RRP se realizó con el método descrito por el grupo de Erwin Neher (Schneppenburger et al., 1999), explicado en detalle en la sección de métodos. Los resultados fueron acordes con observaciones realizadas en la unión neuromuscular, en los que una estimulación a 30 Hz durante 1 min provocaba una intensa depresión del RRP (Wu & Betz, 1998). Interesantemente, el estudio de Wu y Betz atribuyó a la ralentización de 20 veces en la constante endocítica como una posible causa de la depresión y la disminución del RRP. Como se verá, nuestros resultados avalan esta hipótesis.



**Figura R7. Depresión transitoria del tamaño del RRP, tras un período de alta actividad.** Los trazos muestran ejemplos de registros de EPSCs generados por una estimulación a 14 Hz a los tiempos indicados. Obsérvese la depresión en las corrientes tras 3000 estímulos a 20 Hz, y la completa recuperación ~15 min después. La gráfica muestra el cambio relativo del tamaño del RRP (promedio ± error estándar), antes y después de la estimulación tetánica a 20 Hz (n=9 SCMs).

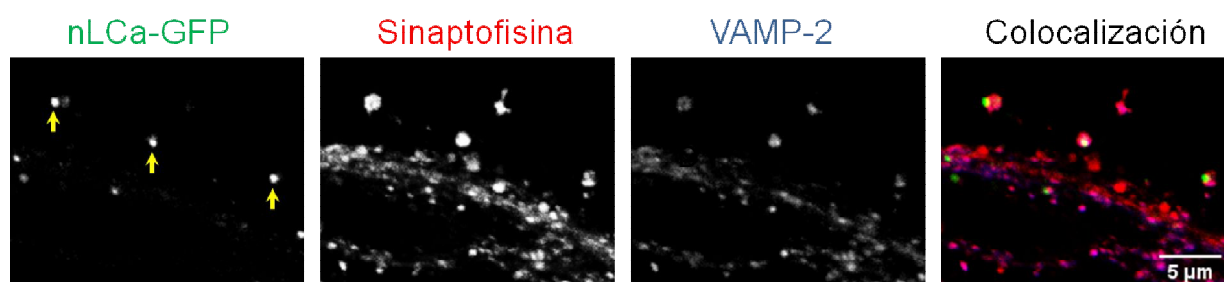
El conjunto de los resultados presentados indica la similitud en el comportamiento plástico de dos tipos de sinapsis colinérgicas: las autapsis de los SCMs y la NMJ. Pero la preparación autáptica colinérgica de los SCMs presenta una gran ventaja, ya que a diferencia de la NMJ se puede mantener *in vitro* durante tres

semanas en ausencia de factores gliales, y cada neurona aislada presenta unas características estereotipadas que dependen de ella misma (Perez-Gonzalez et al., 2008). Por lo tanto, estas razones validan nuestro modelo para el estudio del efecto de la concentración de clatrina sobre la plasticidad presináptica, de manera representativa de una sinapsis colinérgica.

## 2.2. MOVIMIENTO DE LA CLATRINA PRESINÁPTICA DURANTE PERÍODOS DE ACTIVIDAD.

Para hacer el seguimiento de los posibles movimientos de clatrina (Mueller et al., 2004; Granseth et al., 2006), se infectaron las neuronas con lentivirus para expresar la isoforma neuronal de la cadena ligera de clatrina (nLCa) marcada con la proteína fluorescente GFP. Los plásmidos fueron cedidos por el Dr. Stephen J. Royle de la Universidad de Warwick y los lentivirus se generaron en el laboratorio (ver materiales y métodos).

El primer paso fue comprobar dónde se encontraba la construcción GFP-nLCa en las neuronas infectadas. Los SCMs fijados e inmunomarcados mostraron un patrón punteado de fluorescencia, que colocalizaba con otras proteínas presinápticas como sinaptofisina y VAMP-2 (Fig. R8). Así, se podía afirmar que, de forma similar a los trabajos previos en hipocampo (Mueller et al., 2004; Granseth et al., 2006), la GFP-nLCa se encontraba enriquecida en los terminales presinápticos.

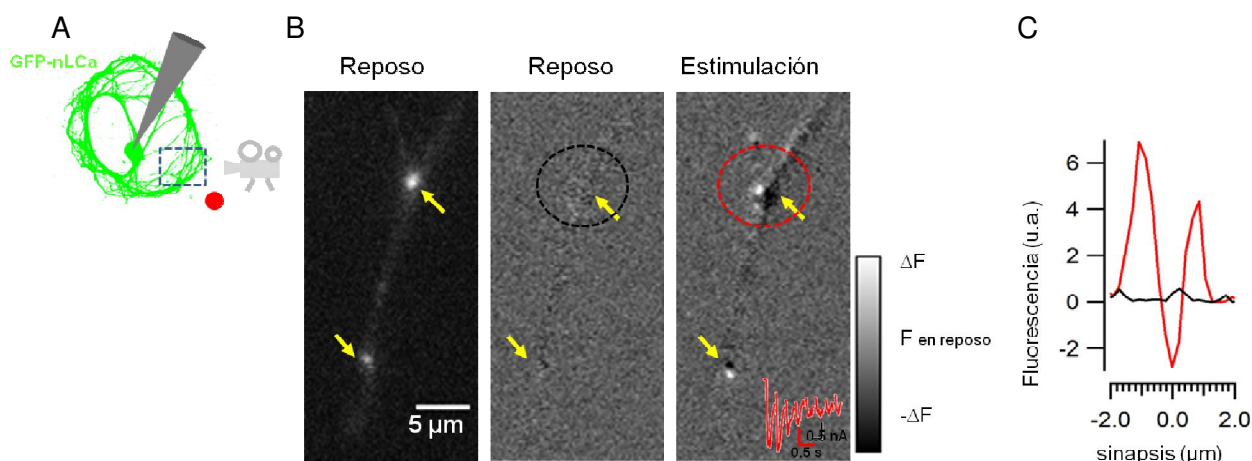


**Figura R8. La construcción GFP-nLCa se acumula en las sinapsis.** Puntos discretos de fluorescencia de GFP-nLCa (flechas) expresada en los procesos axo-dendríticos de un SCM. Estos puntos colocalizan con otras proteínas presinápticas como sinaptofisina y VAMP-2, indicando que GFP-nLCa se concentra principalmente en las sinapsis.

Para evaluar el posible comportamiento dinámico de clatrina durante los períodos de estimulación, se visualizó la fluorescencia de GFP-nLCa mientras se aplicaba un tren de estímulos a 20 Hz. Durante el período de actividad, GFP-nLCa

difundió hacia el espacio perisináptico. La concentración de fluorescencia cayó en el punto sináptico identificado y aumentó en las regiones perisinápticas (Fig. R9).

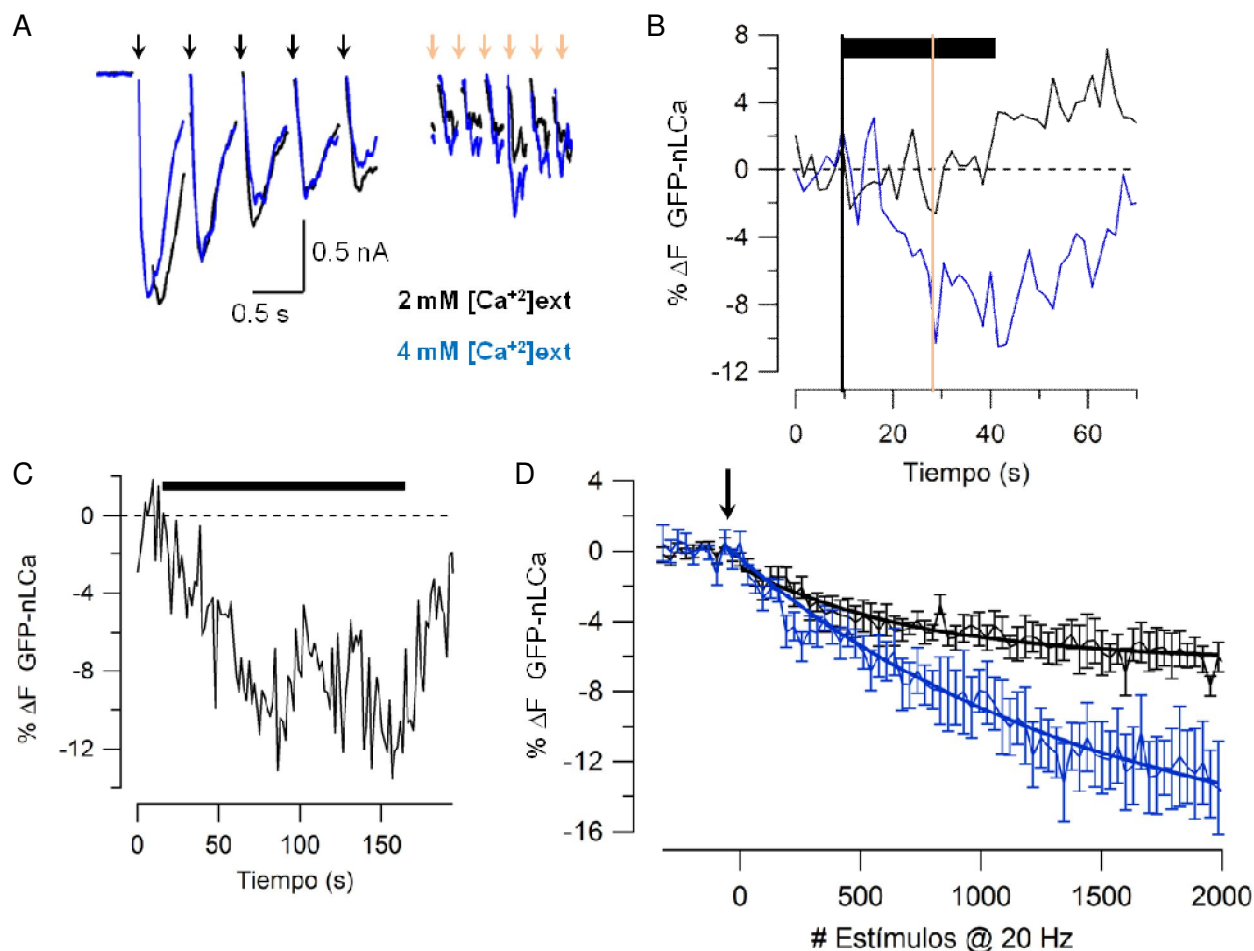
Este efecto coincidió con el observado por Lagnado y colaboradores en neuronas de hipocampo al aplicar 400 estímulos a 20 Hz (Granseth et al., 2006), donde clatrina caía ~4% en los terminales presinápticos. Nuestras observaciones apoyaron la visión de que las proteínas sinápticas, como por ejemplo VAMP 2 (Sankaranarayanan & Ryan, 2000), abandonan la sinapsis durante la estimulación.



**Figura R9. La concentración sináptica de clatrina disminuye durante la estimulación.** A) Visualización del comportamiento de GFP-nLCa durante la estimulación, y registro de la actividad neuronal. B) (Izq) Imagen de dos sinapsis individuales (flechas) identificadas en período de reposo. (Centro) Imagen obtenida tras la sustracción de los valores basales de fluorescencia. El color gris indica reposo. (Dcha) Imagen que muestra los cambios netos en la fluorescencia tras las aplicaciones de 800 estímulos a 20 Hz. Obsérvese una caída de fluorescencia en las sinapsis (color negro) y una acumulación en la periferia (color blanco). C) Cambio de fluorescencia de la sinapsis superior de (B). Los trazos indican antes (negro) y durante la estimulación (rojo).

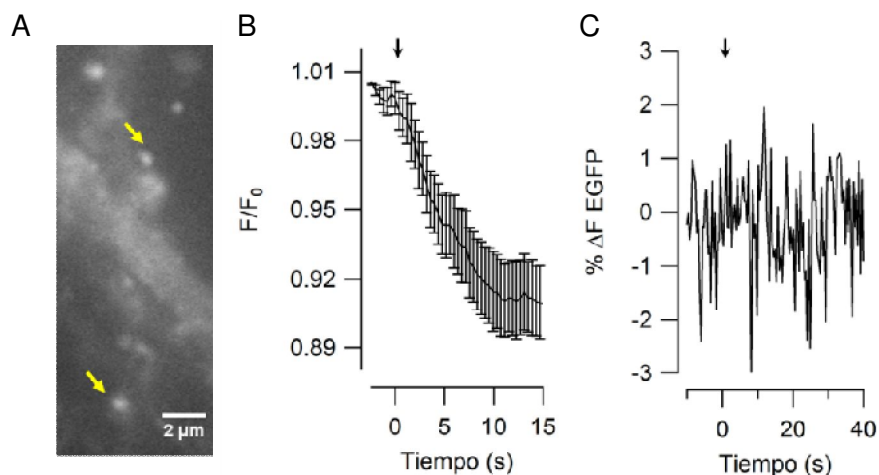
Debido a la importancia de la Pr durante la maduración de los SCMs y en la determinación de la plasticidad sináptica a corto término, modificamos este parámetro variando la  $[Ca^{+2}]_{ext}$  de 2 a 4 mM. El incremento de la Pr, se evidenció en un aumento de la potencia sináptica. La diferencia no se observó en los primeros EPSCs evocados por la estimulación, sino pasado un tiempo cuando la depresión era evidente (Fig. R10A). En el ejemplo que se muestra en la Fig. R10B se puede observar como 600 estímulos a 20 Hz no provocaron casi cambio en la fluorescencia de las sinapsis estudiadas a 2 mM  $[Ca^{+2}]_{ext}$ , en cambio, a 4 mM  $[Ca^{+2}]_{ext}$ , se observó un desplazamiento de clatrina. Es decir, el movimiento dependía de la probabilidad de liberación y por tanto de la potencia sináptica. En condiciones de máxima Pr se alcanzó una caída transitoria del ~15%, con 2000 estímulos a 20 Hz, que se recuperaba ~20 s después (Figs. R10C y D).





**Figura R10. El movimiento de clatrina durante la estimulación es dependiente de la probabilidad de liberación.** A) Al aumentar la probabilidad de liberación, de 2mM a 4 mM  $[Ca^{+2}]_{ext}$ , se incrementa la potencia sináptica, no tanto en los primeros EPSCs evocados (flechas negras) con la estimulación a 20 Hz, sino cuando la depresión es evidente (flechas claras). B) Diferencia en el cambio de fluorescencia con 600 estímulos a 20 Hz (barra gruesa), entre dos sinapsis que operan a diferente probabilidad de liberación. Las barras verticales indican dos momentos diferentes en la estimulación, al principio (negra) o a mitad (clara), referidos en la Fig. (A). C) Cambio de la fluorescencia de GFP-nLca en una sinapsis individual, en la que se observa una caída transitoria de >12%, durante 3000 estímulos a 20 Hz (barra) que revierte al finalizar la estimulación. D) Cambio promedio de la fluorescencia de nLca-GFP en función del número de estímulos a 20 Hz y del  $[Ca^{+2}]_{ext}$ . (n=14 y 13 con  $[Ca^{+2}]_{ext}$ =2 y 4 mM, respectivamente). Los trazos indican los valores promedios  $\pm$  error estándar.

Recientemente se había demostrado que los terminales presinápticos podían acidificarse durante intensos períodos de estimulación (Rossano, Chouhan, & Macleod, 2013), hecho que podía inactivar transitoriamente a la GFP y causar la caída de la fluorescencia. Para descartar esta posibilidad, se decidió estudiar la fluorescencia en sinapsis de SCMs infectados para expresar GFP citosólico. Tras identificar los terminales presinápticos con FM4-64 mediante estimulación (Fig. R11A-B), no se observó ningún cambio en la fluorescencia de GFP cuando las neuronas se sometieron a >800 estímulos a 20 Hz (Fig. R11C).

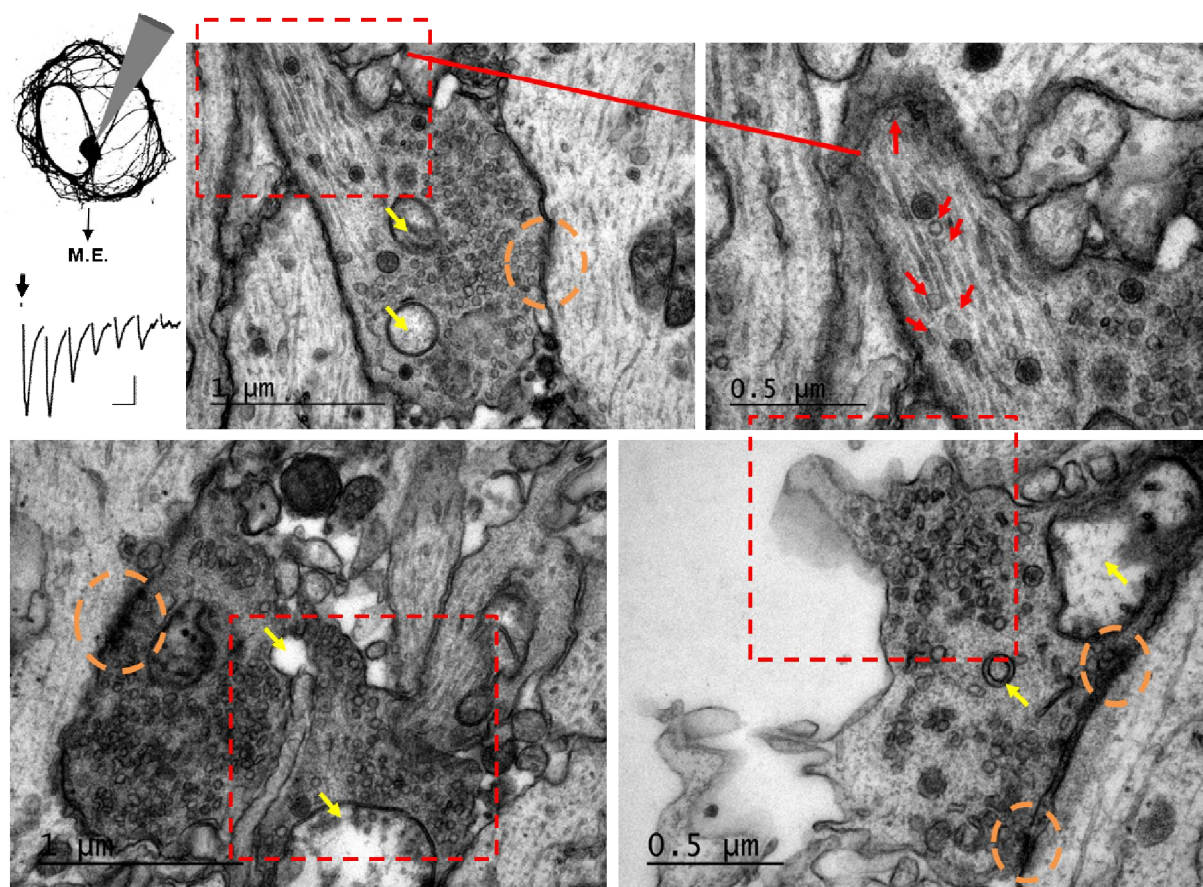


**Figura R11. Los terminales no se acidifican significativamente durante una estimulación prolongada.** A) Terminales axónicos identificados (flechas) mediante puntos discretos de fluorescencia de FM4-64. La neurona expresa GFP en el citosol. B) La gráfica indica la caída de fluorescencia relativa promedio de FM4-64 ( $n=20$  sinapsis) por la descarga con 480 estímulos a 20 Hz (la flecha indica el comienzo de la estimulación). La gráfica muestra los valores promedio  $\pm$  error estándar. C) Cambio de fluorescencia de GFP con 800 estímulos a 20 Hz (flecha indica comienzo) en el promedio de las sinapsis identificadas en (B). Obsérvese que la fluorescencia no cambia durante la estimulación.

Este resultado permitió validar las observaciones obtenidas con GFP-nLCa. Bajo intensa estimulación se producía una salida del 10-15% del total de clatrina del terminal. Nuestros resultados sugerían que la elevada fusión de vesículas sinápticas causaba la difusión lateral del "carga" hasta salir del terminal. Como consecuencia, los *triskelion* de clatrina se debían desplazar a zonas perisinápticas para generar las jaulas de endocitosis, resultando en una disminución de la proteína dentro del terminal presináptico. Pero esta disminución de los niveles disponibles de la proteína podría ser incluso más intensa. Parte del total de clatrina del terminal se encuentra recubriendo otras estructuras y por tanto no está libre para formar nuevos CCPs con la llegada de un estímulo (Goud et al., 1985; Kamin et al., 2010; Hua et al., 2011). A partir de nuestro análisis de la ultraestructura de los terminales, se observó que en sinapsis en reposo  $\sim 6$  vesículas se encuentran recubiertas por clatrina, implicando  $\sim 360$  *triskelions*. Con la estimulación este número puede llegar a incrementarse unas tres veces. Por ello, el 10-15% de salida de la proteína (Fig. R10D), es muy probablemente que sea una subestimación de la caída real de los niveles disponibles durante un período de estimulación.

Para obtener una imagen a alta resolución de la salida funcional de clatrina hacia la región perisináptica, se realizó la microscopía electrónica correlativa de neuronas registradas a alta estimulación (figura R12). La evidencia más clara fue un

aumento de formas endosomales en el terminal, posiblemente por la activación de otros mecanismos de endocitosis a alta estimulación (*bulk-endocytosis*). A nivel cualitativo se observó un aumento en la dispersión de las vesículas sinápticas y la presencia de éstas en las regiones límites del terminal, lejanas de la zona activa, incluyendo fuera de los terminales presinápticos. Aunque esta evidencia podría sugerir una endocitosis en regiones perisinápticas, el bajo número de observaciones no permitió obtener datos concluyentes. También se realizó el estudio correlativo con inmunomarcaje de la cadena pesada de clatrina con partículas de oro (*inmuno-gold*). A pesar de que se obtuvo una señal específica, el número de marcas fue muy bajo y no se pudo cuantificar la salida de clatrina del terminal. .

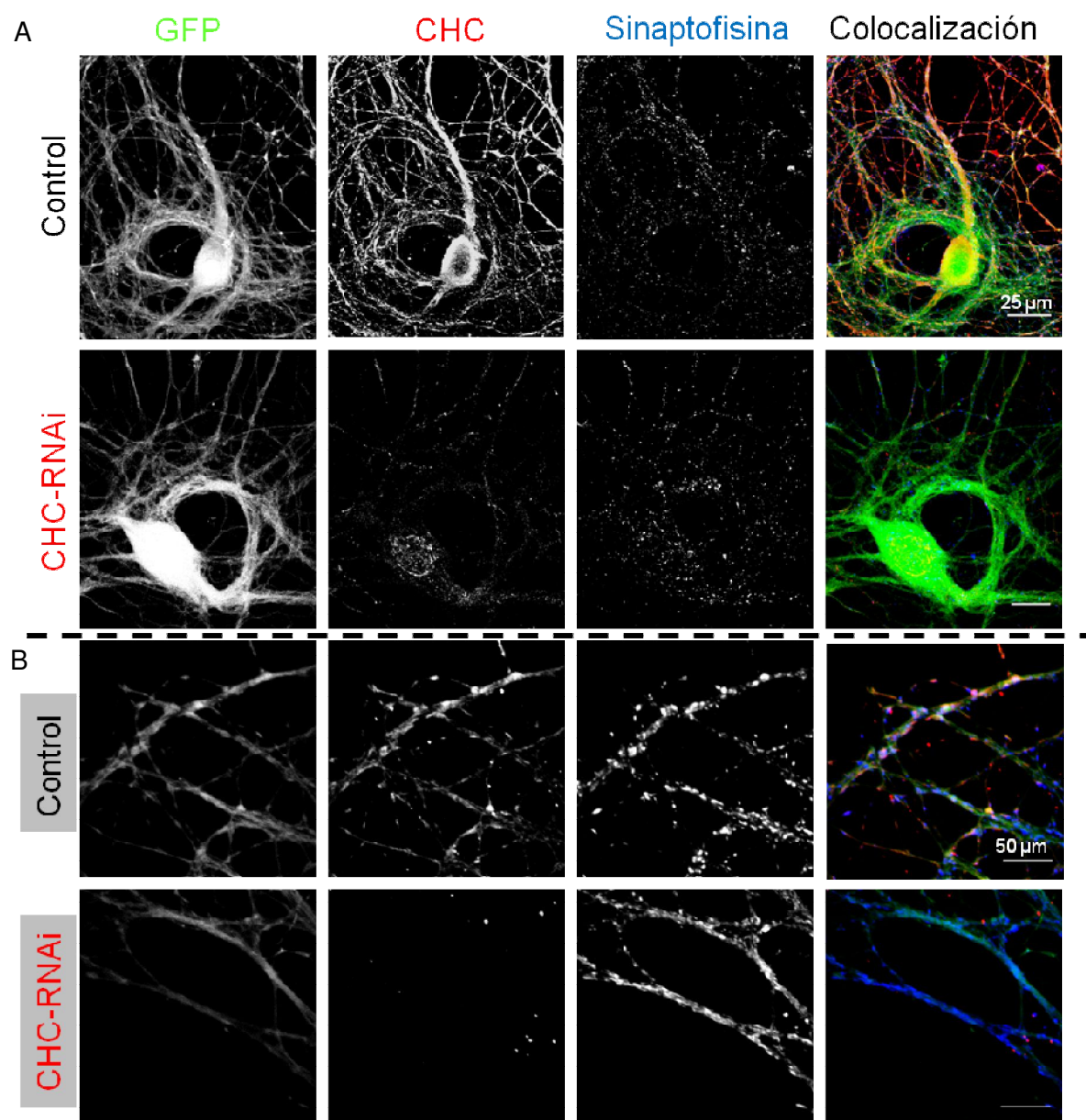


**Figura R12. Ultraestructura de terminales axosomáticos de un SCM sometido a alta frecuencia de estimulación.** El esquema muestra un SCMs registrado con 3000 estímulos a 20 Hz. Después de ser microografiado y fijado, la neurona es procesada para microscopía electrónica. Las imágenes muestran terminales (recuadro rojo) lejanas de las zonas activas (círculo naranja). También se observan numerosos cuerpos endosomales (flechas amarillas) pero no se advierten estructuras recubiertas de clatrina.

Una vez demostrado que los niveles de clatrina en el terminal presináptico eran dinámicos, la siguiente cuestión consistió en dilucidar cómo afectaba la disponibilidad de esta proteína a la neurotransmisión. Por tanto, se planteó una

estrategia para manipular los niveles de clatrina experimentalmente e imitar la pérdida de esta proteína en los terminales presinápticos durante la estimulación a alta frecuencia.

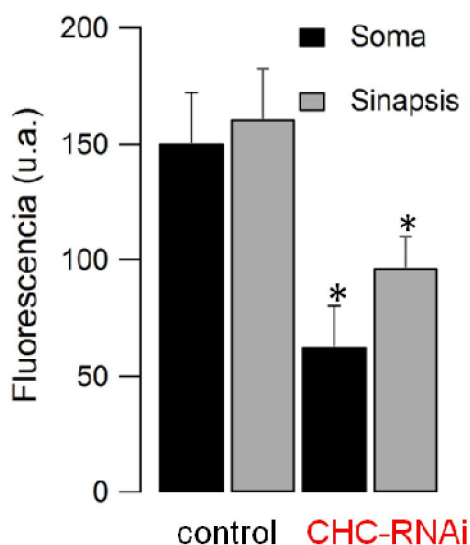
### 2.3. EFECTO DE LOS NIVELES DE CLATRINA PRESINÁPTICA SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN.



**Figura R13. Reducción de los niveles endógenos de CHC mediante RNAi.** A) Imágenes de microscopía confocal que comparan el marcaje de CHC en una neurona control con una CHC-RNAi. B) Marcaje de CHC en los procesos sinápticos identificados con puntos de sinaptofisina. En (A) y (B) obsérvese la reducción de los niveles de CHC en neuronas que producen el RNAi. No se observa un cambio en el marcaje de sinaptofisina.

Puesto que la supresión completa de expresión (*knock-out, KO*) de clatrina es inviable (Heerssen et al., 2008), conseguimos reducir los niveles parcialmente (*knock-down, KD*) infectando las neuronas autópticas con lentivirus para producir un RNA de interferencia (RNAi) contra la cadena pesada de clatrina (CHC, *clathrin heavy chain*) acoplado a la expresión de GFP. A estas neuronas las definiré como CHC-RNAi. El grupo de neuronas control fueron infectadas para expresar GFP sólo ó GFP-GL2-RNAi, este último un RNAi de la proteína GL2 (*homeodomain leucine zipper transcription factor GLABRA2*), inocuo para las neuronas y que sirve de RNAi control. Como entre las neuronas GFP y las neuronas GFP-GL2-RNAi no se encontraron diferencias, definiré a todo este grupo como control. Los plásmidos fueron cedidos por el Dr. Stephen J. Royle, y se elaboraron los lentivirus en el laboratorio.

Al realizar la inmunofluorescencia para CHC, se observó que las neuronas control presentaron niveles normales tanto en el soma como en los procesos sinápticos (Fig. R13A). Las sinapsis putativas identificadas con puntos de sinaptofisina, también presentaron niveles homogéneos de CHC respecto al resto de la célula (Fig. R13B). En cambio, en las neuronas CHC-RNAi se advirtió una reducción significativa de los niveles de CHC tanto en el soma como en los procesos (Figs. R13-14).



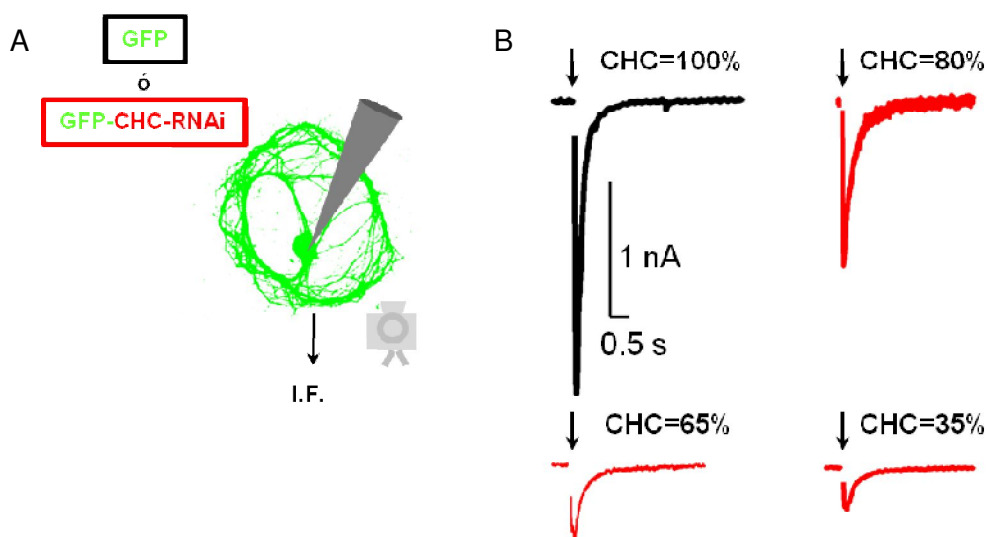
**Figura R14. CHC-RNAi reduce los niveles endógenos de CHC en soma y en sinapsis.** Cuantificación de los niveles de CHC en el soma (n=6 y 7 neuronas control y RNAi, respectivamente) y en las sinapsis (n=2166 y 1157 sinapsis en neuronas control y RNAi respectivamente), identificadas por puntos de sinaptofisina. Se muestran los valores promedios  $\pm$  error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Puesto que clatrina juega un papel muy importante en el reciclaje de las vesículas sinápticas, nos preguntamos si la reducción de los niveles endógenos de CHC podía estar afectando artefactualmente a la expresión de proteínas de la

membrana vesicular. Para ello se evaluó el marcaje de sinaptofisina y VAMP-2, debido a que ambas proteínas son componentes fundamentales de la composición de las vesículas sinápticas (Takamori et al., 2006). Sinaptofisina apareció con una densidad de  $0.05 \pm 0.02$  y  $0.04 \pm 0.02$  puntos  $\cdot \mu\text{m}^{-2}$  en SCMs control (n=5) y CHC-RNAi (n=10), respectivamente. VAMP-2 tampoco varió, encontrándose a una densidad de  $0.09 \pm 0.02$  y  $0.07 \pm 0.02$  puntos  $\cdot \mu\text{m}^{-2}$  en controles (n=6) y CHC-RNAi (n=9), respectivamente. Puesto que no existieron diferencias entre ambas condiciones, consideramos que la reducción de los niveles de CHC aparentemente no afectó a la expresión de otras moléculas de las vesículas sinápticas.

*Clathrin Heavy Chain* (CHC) está en una proporción 1:1 con la LCa para formar los *triskelion* solubles funcionales (Xing et al., 2010). Es decir, no existen cadenas libres en el citoplasma, y en consecuencia la reducción de CHC suponía una disminución de clatrina funcional.

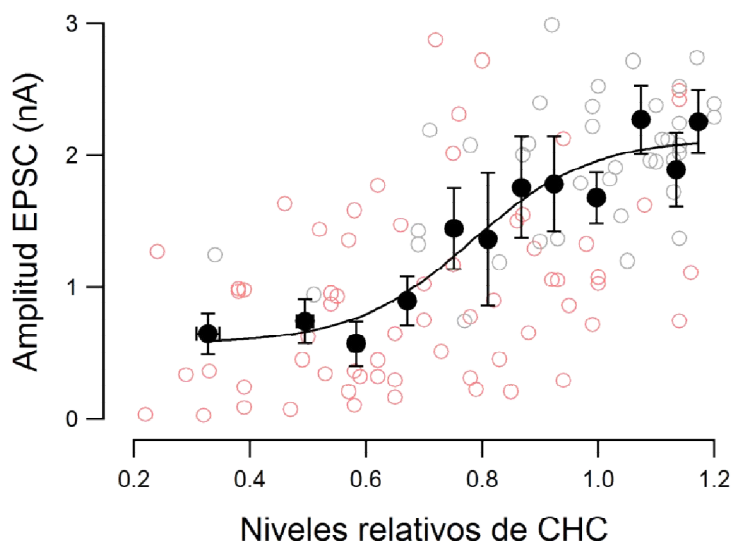
A pesar de que en estudios previos el RNAi de CHC había permitido reducir los niveles de la proteína y afectar a la funcionalidad de las sinapsis (Granseth et al., 2006), nuestras observaciones a nivel de célula individual demostraron que el método presentaba una gran variabilidad. Existieron grandes diferencias en la reducción de los niveles de expresión de CHC, incluso entre neuronas infectadas de un mismo cubreobjetos. Mientras algunas presentaron niveles similares a SCMs control, otras casi no presentaron señal de expresión de CHC.



**Figura R15. Dependencia de los EPSCs de los niveles endógenos de clatrina.** A) Modelo esquemático del experimento. A cada neurona infectada y registrada se le calcula su nivel relativo de CHC por inmunofluorescencia (I.F.). B) Ejemplos de EPSCs y sus niveles endógenos relativos de CHC. Obsérvese la caída del EPSC asociado con la reducción de clatrina. La flecha indica el estímulo eléctrico.

La variabilidad nos llevó a estudiar cada célula individualmente realizando dos técnicas correlativas secuenciales: electrofisiología y microscopía de inmunofluorescencia. Cada SCM registrado fue micrografado, fijado e inmunomarcado para CHC. Posteriormente fue identificado en el microscopio de fluorescencia convencional o confocal para cuantificar el nivel de expresión relativo a los valores control.

La primera observación fue una reducción de los EPSCs cuando los niveles de CHC disminuían (Fig. R15). La variación en la amplitud del EPSC en función de los niveles de clatrina relativos se ajustó a una función sigmoïdal (Fig. R16). El elevado coeficiente de Hill,  $\sim 7.6$ , sugirió un alto nivel de cooperatividad, de modo similar a resultados previos en células no neurales (Moskowitz et al., 2005). Es decir, caídas aparentemente pequeñas de los niveles de clatrina tenían un efecto significativo sobre los EPSCs. Por ejemplo, una disminución del  $\sim 20\%$  en los niveles endógenos de CHC redujo  $\sim 43\%$  la amplitud del EPSC. Cuando los niveles de clatrina disminuyeron  $\geq 80\%$ , no se observó neurotransmisión, probablemente debido a una pérdida total de función o incluso muerte celular. En promedio, las respuestas sinápticas fueron de  $\sim 0.6$  nA en células con niveles reducidos niveles de CHC y  $\sim 2$  nA en SCMs con niveles normales.

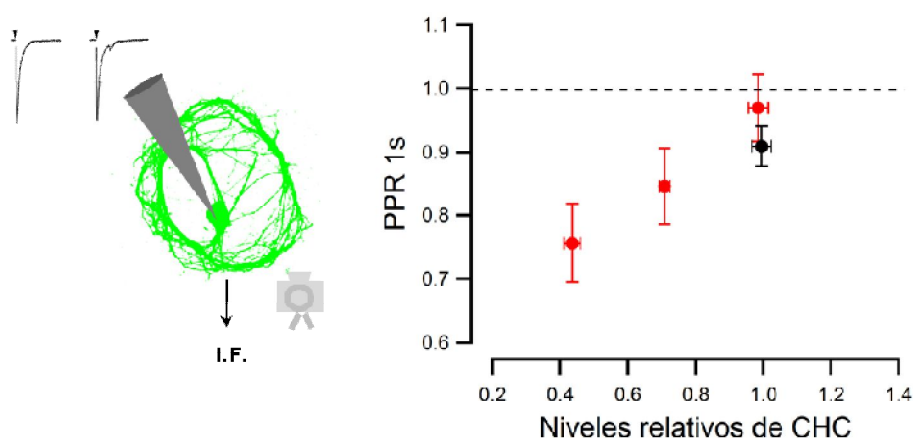


**Figura R16. La neurotransmisión depende de los niveles de clatrina.** Relación entre los EPSCs y los niveles endógenos relativos de CHC. La línea muestra el ajuste de una función sigmoïdal, con un valor de  $[\text{clatrina}]_{50}$  de 0.78. Los datos individuales de cada célula (círculos abiertos,  $n=134$ , control en negro y CHC-RNAi en rojo) fueron agrupados en conjuntos (puntos). Obsérvese la gran variabilidad en las células CHC-RNAi. Se representan los valores promedios del conjunto  $\pm$  error estándar.

Puesto que los niveles de CHC estaban afectando a la amplitud de los EPSCs, se trató de averiguar si también influían en el tiempo de llegada a esta amplitud (*rise-time*), es decir si estaban modificando las propiedades de la excitosis. No se observaron diferencias significativas en la constante de tiempo del 10-90% de la amplitud del EPSC entre las células control ( $\tau_{10-90\%}=7.52\pm 0.97$  ms, n=26 SCMs) y las células CHC-RNAi ( $\tau_{10-90\%}=7.03\pm 0.46$  ms, n=41 SCMs).

Como en la generación del EPSC están participando tanto el terminal presináptico como el postsináptico, se diseñaron dos estrategias para tratar de separar ambos componentes y observar si los cambios en los niveles de CHC afectaban a ambos elementos. Por un lado se estudió la plasticidad a corto plazo mediante el protocolo de pulsos pareados, cuyos cambios dependen esencialmente del terminal presináptico (Fig. R17). Por otro, se comparó en un mismo SCM la respuesta evocada por un estímulo eléctrico despolarizante con la respuesta generada por la aplicación local de una microgota de acetilcolina (Fig. R18). La presencia de ACh permite la activación sólo de los receptores postsinápticos sin la participación del terminal presináptico, y por tanto supone un buen método para descartar cambios a nivel postsináptico.

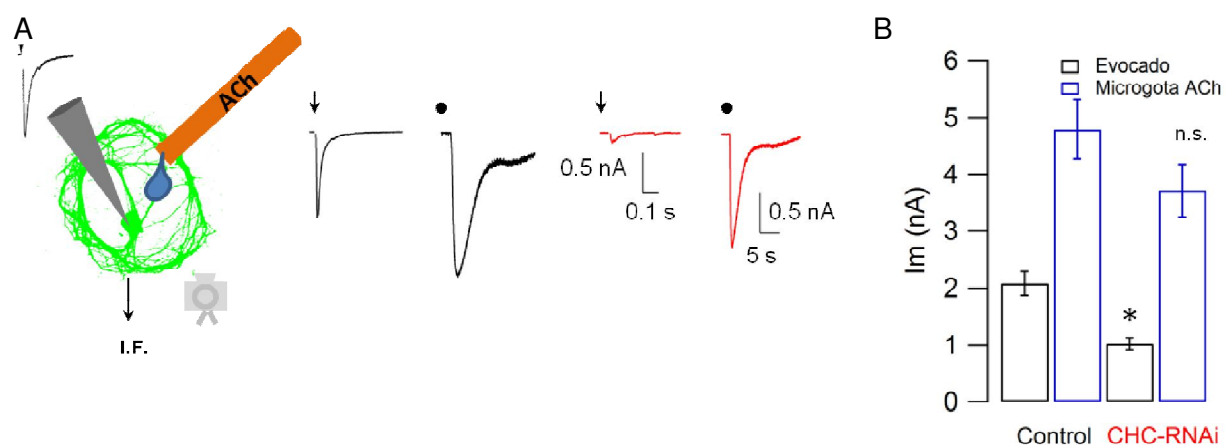
Como se observó en la Fig. R4, los SCMs con sinapsis funcionales maduras presentan un PPR1s de  $\sim 1$  (Perez-Gonzalez et al., 2008; Albrecht et al., 2012). Las células que presentaron unos niveles relativos de CHC normales mostraron un PPR1s  $\sim 1$ . En cambio cuando los niveles de clatrina se vieron reducidos  $>20\%$ , el PPR apareció disminuido y la depresión fue de  $\sim 20-25\%$ . El conjunto de los datos demostró que la PPR dependía de clatrina (figura R17).



**Figura R17. La plasticidad presináptica depende de los niveles endógenos de CHC.** Aplicación de pulsos pareados con 1 s de intervalo. Se muestran los valores promedios del PPR agrupados para diferentes caídas de los niveles endógenos de CHC (n=138 SCMs). Se representan los valores promedios  $\pm$  error estándar.



En un segundo grupo de experimentos se comparó el EPSC generado por la aplicación de una microgota de ACh 1 mM, con un EPSC generado eléctricamente. Los resultados evidenciaron que los EPSCs generados químicamente fueron más grandes que aquéllos generados eléctricamente (Fig. R18), demostrando que los receptores postsinápticos no estaban saturados por la ACh del estímulo eléctrico previo. Mientras que existieron diferencias significativas en los EPSCs generados eléctricamente entre las células control y las CHC-RNAi, no se obtuvieron cambios significativos en la respuesta evocada químicamente.

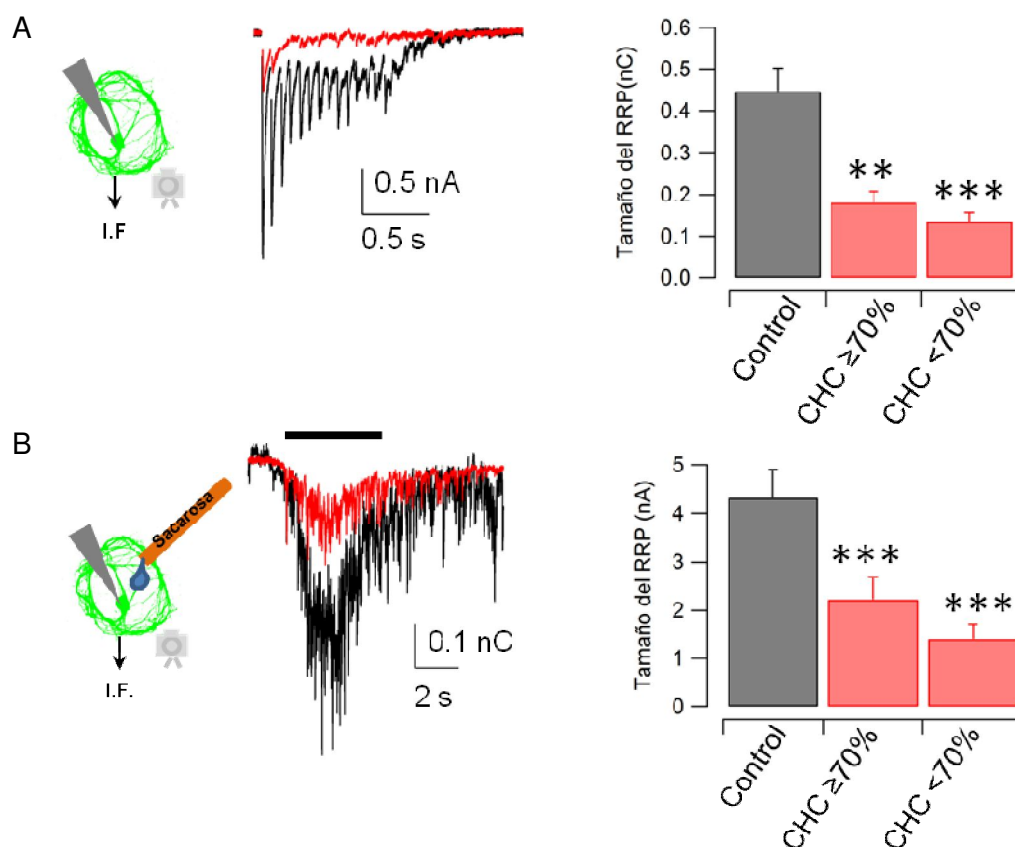


**Figura R18. Los efectos de la variación de CHC sobre la neurotransmisión, son principalmente de origen presináptico.** A) Aplicación, en la misma célula, de un pulso despolarizante (flecha) y una gota de ACh 1 mM (punto), 3 min después. Cada célula registrada es inmunomarcada para conocer su valor relativo de CHC. El EPSC evocado por la gota de ACh es mayor que el EPSC evocado por estímulo eléctrico. B) Datos promediados (n=7 y 11 neuronas control y CHC-RNAi respectivamente). Mientras que se observa una diferencia significativa en las respuestas pre- y postsinápticas por estimulación eléctrica ( $p < 0.05$ ), no es significativa en la respuesta únicamente postsináptica por estimulación química.

El conjunto de las observaciones demostró que el terminal presináptico era especialmente sensible a los cambios en los niveles endógenos de clatrina, ya que pequeñas variaciones generaban cambios importantes en la transmisión sináptica.

A continuación nos preguntamos si la mayor depresión observada con bajos niveles de CHC podía ser consecuencia de una alteración de los depósitos de liberación, principalmente del RRP, responsable de la plasticidad a corto plazo (Denker & Rizzoli, 2010). Para obtener una baja y una alta estimación del tamaño del RRP, respectivamente, se utilizaron dos paradigmas (Fig. R19): el análisis acumulativo de los EPSCs evocados por un tren de estímulos a 14 Hz (Schneeggenburger et al., 1999), y la aplicación local de una solución hiperosmótica de sacarosa 500 mOsm (Rosenmund & Stevens, 1996). El primer método

proporciona una baja estimación del RRP porque sólo se consideran las vesículas que se liberan de forma sincrónica con el estímulo, aquéllas que muestran un mejor acoplamiento a los canales de calcio presinápticos. En cambio, el segundo método favorece la liberación de todas las vesículas ancladas a la zona activa, y por esto resulta una alta estimación del tamaño del RRP.



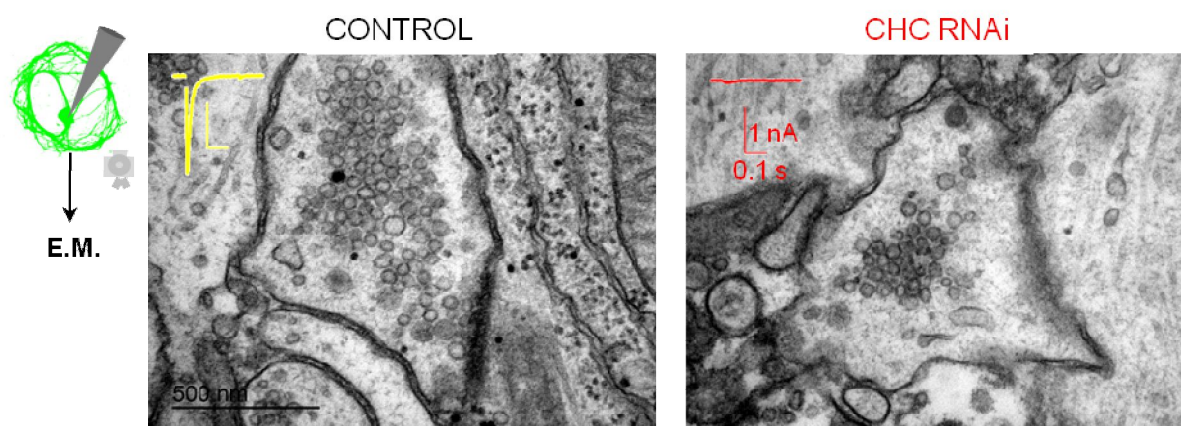
**Figura R19. La caída de los niveles clatrina reduce el tamaño del RRP.** A) Ejemplos de EPSCs generados tras la aplicación de sendos trenes de estímulos a 14 Hz en una neurona control (negro) y una CHC-RNAi (rojo). En promedio la caída de  $\leq 30\%$  en los niveles de CHC reduce a la mitad el tamaño del RRP respecto al control. Una reducción de  $\geq 30\%$  supone una disminución a un tercio del RRP control (\*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ). B) Mismo procedimiento que en (A) pero con la estimación del RRP mediante aplicación local de una gota de sacarosa 500 mOsm durante 5 s (barra). Los valores se representan con el error estándar.

A partir de los datos promedios obtenidos con ambas estimaciones y asumiendo que una única vesícula generaba una corriente de  $\sim 60$  pA, equivalente a la transferencia de una carga de  $\sim 2$  pC (Perez-Gonzalez et al., 2008), se calculó que el RRP liberado en SCMs control contenía  $\sim 70\sim 220$  vesículas sinápticas. Considerando un promedio de 25 sinapsis axosomáticas calculadas por SCMs en un trabajo previo del laboratorio (Albrecht et al., 2012), se dedujo que cada terminal presináptico tendría  $\sim 3\sim 9$  vesículas formando parte del RRP. El RRP era muy sensible a pequeños cambios en CHC. Así, una reducción  $\leq 30\%$  de los niveles

endógenos de CHC (*knock-down* moderado), redujo el tamaño del RRP la mitad o más, ~41~90 vesículas. Y una caída >30% (*knock-down* intenso), redujo el RRP a un tercio, ~22~67 vesículas (Fig. R19A y B).

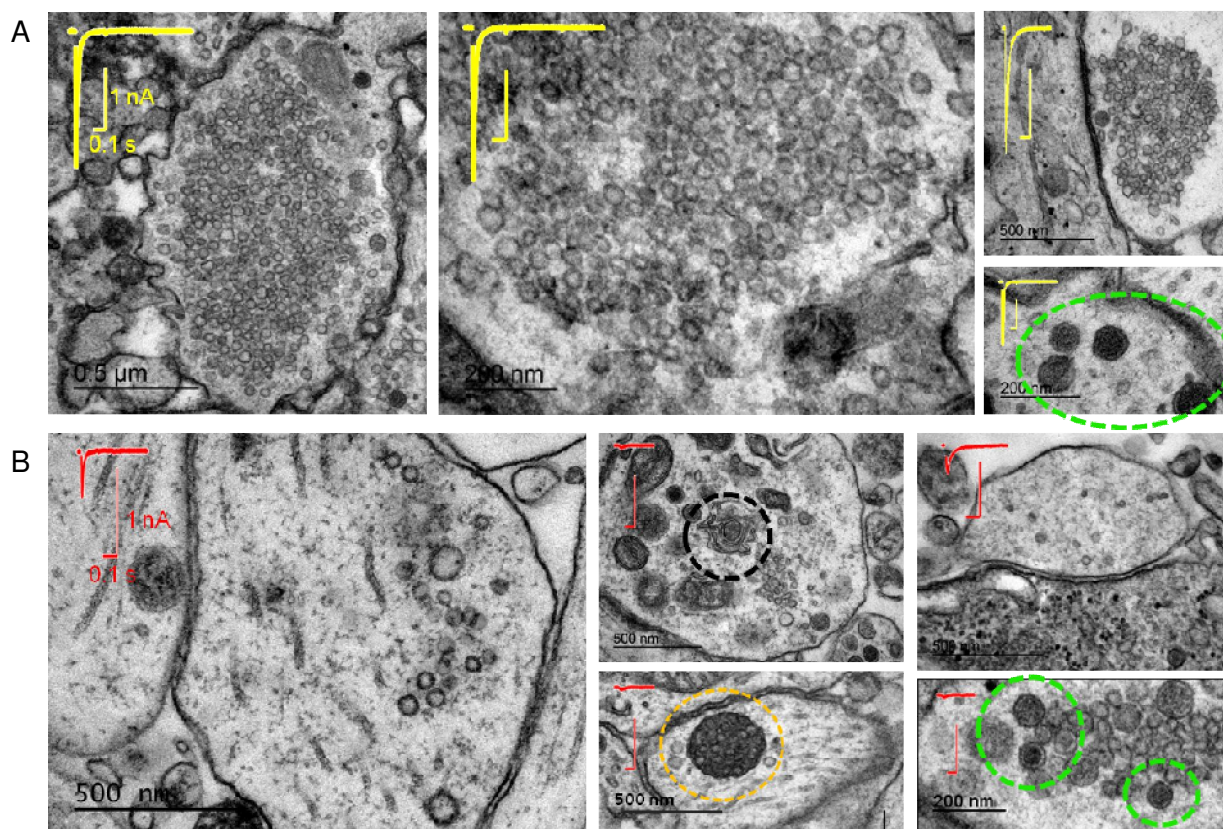
Puesto que los cambios funcionales podían estar relacionados con cambios morfológicos, y el RRP ha sido clásicamente asociado al depósito de vesículas ancladas a la zona activa de la sinapsis, se decidió correlacionar electrofisiología con la microscopía electrónica (ver materiales y métodos para más detalles). Ante la imposibilidad de realizar inmunofluorescencia en las células que fueron procesadas para microscopía electrónica, la concentración relativa de clatrina fue calculada mediante la extrapolación de la amplitud del EPSC en la Fig. R16. Así se estudiaron 3 células control con un EPSC promedio de 1.6 nA y 4 células CHC-RNAi correspondientes a un *knock-down* intenso y amplitud del EPSC entre 0.1 y 0.8 nA.

Las imágenes de la ultraestructura se obtuvieron de cortes aleatorios de las células identificadas. La primera observación sobre un número similar de sinapsis en ambas condiciones (31 y 30 terminales presinápticos en neuronas control y CHC-RNAi respectivamente) fue la presencia de zonas activas definidas. Por lo tanto, los niveles de clatrina no estaban afectando a los contactos sinápticos. Mientras en los controles se observaron entre 2 y 6 vesículas ancladas a la zona activa, en el caso de células CHC-RNAi la mayoría de los terminales presinápticos mostraron unas densidades vacías de vesículas. Esta observación en la ultraestructura resultó coherente con los resultados de la estimación funcional del RRP. Asumiendo un número de contactos axosomáticos similar a los controles, a cada zona activa le corresponderían entre 0 y 3 vesículas (Fig. R20).



**Figura R20. La caída de los niveles clatrina reduce número de vesículas ancladas a la zona activa.** (Izq) Ultraestructura de un terminal axosomático de un neurona control. Se puede ver una zona activa definida con 4-5 vesículas ancladas. (Dcha) Terminal axosomático de una neurona CHC-RNAi. La zona activa está vacía de vesículas sinápticas. Los trazos representan el EPSC asociado a cada célula.

Pero no sólo resultó evidente una reducción en la cantidad de vesículas ancladas a la zona activa, sino también en el número total de vesículas citoplasmáticas tanto en contactos axosómáticos como axodendríticos (Fig. R21).

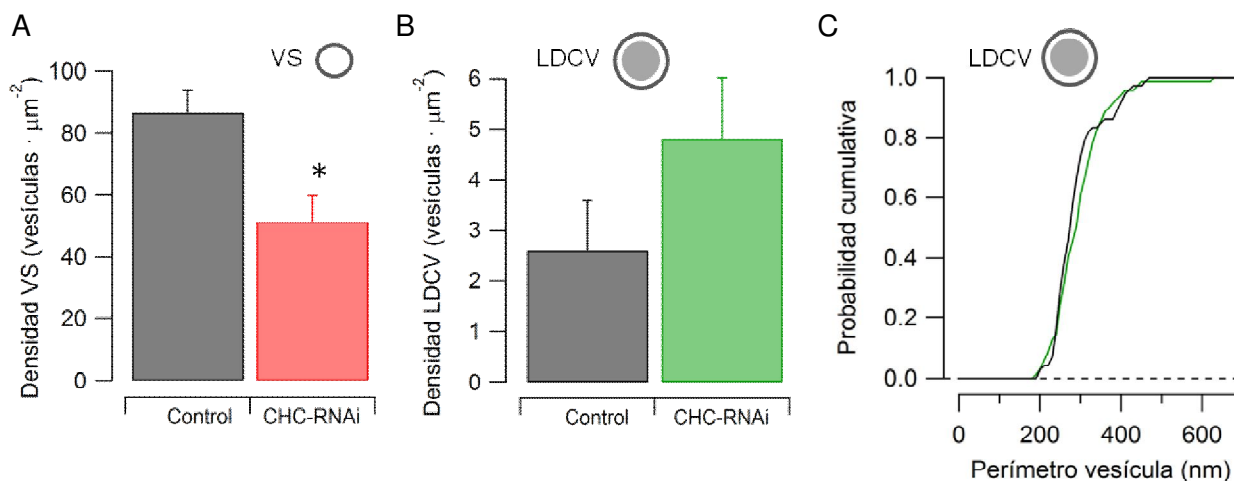


**Figura R21. Efecto de la reducción de los niveles de clatrina en las vesículas sinápticas y en las LDCVs.**  
 A) Terminales presinápticos de control. Presentan una elevada densidad de vesículas. Las LDCVs (línea punteada verde) están en una densidad de  $2.61 \pm 0.98$  LDCVs  $\cdot \mu\text{m}^{-2}$ . No se observan endosomas ni cuerpos multivesiculares.  
 B) Terminales presinápticos de neuronas CHC-RNAi. Obsérvese la importante depresión en la densidad de las vesículas sinápticas. Se evidencian algunas cisternas endosomales (línea punteada negra) y cuerpos multivesiculares (línea punteada amarilla). No se encuentra alterado ni el tamaño ni la densidad de LDCV.

Debido a que el área de los terminales resultó incrementada de  $0.68 \pm 0.07 \mu\text{m}^2$  en células control a  $0.90 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$  en neuronas CHC-RNAi, la densidad de vesículas en los terminales presinápticos se redujo de  $87 \pm 7$  vesículas  $\cdot \mu\text{m}^{-2}$  en los SCMs control a  $51 \pm 8$  vesículas  $\cdot \mu\text{m}^{-2}$  en los tratados (Fig. R22A).

En los terminales también se encontraban vesículas grandes de núcleo denso (LDCV, *large dense core vesicles*) mezcladas entre las vesículas sinápticas (Fig. R21). Las LDCVs presentaron una menor sensibilidad a los niveles de clatrina ya que su densidad no varió de forma significativa cuando los niveles de CHC fueron disminuidos (Fig. R22B). Asimismo, el análisis de las dimensiones de las LDCV, no evidenció cambios entre el grupo control ( $95 \pm 2$  nm de diámetro,  $n=72$ ) y el tratado

( $97 \pm 3$  nm de diámetro,  $n=69$ , Fig. R22C). Las diferencias entre las vesículas sinápticas y las LDCVs se atribuyeron a su biogénesis diferente. Las LDCVs se generan a partir del *trans-Golgi* y viajan hasta el terminal. No se reciclan a partir de endosomas como las vesículas sinápticas.

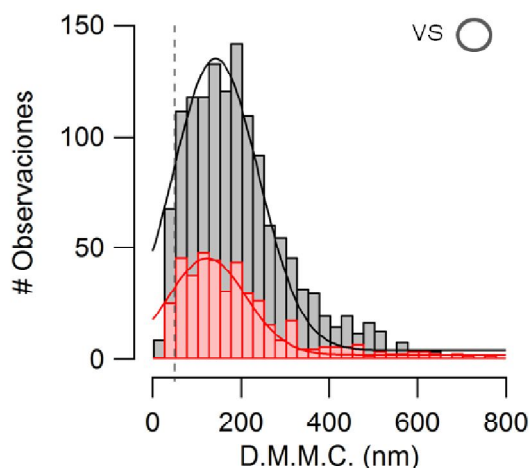


**Figura R22. La reducción de los niveles endógenos de clatrina afecta principalmente a las vesículas sinápticas.** A) Cambio significativo en la densidad de las vesículas sinápticas (VS) cuantificadas en 31 y 30 terminales presinápticos de neuronas control y CHC-RNAi respectivamente ( $p < 0.05$ ). B) La densidad de las LDCVs no resulta significativamente alterada. C) La reducción en los niveles de clatrina no varió el tamaño de las LDCVs, como se evidencia en la distribución acumulativa del perímetro de todas las vesículas estudiadas tanto en terminales control (negro,  $n=72$ ) como en CHC-RNAi (verde,  $n=69$ ).

Otra observación en los terminales CHC-RNAi, fue la alta densidad de estructuras endosomales de grandes dimensiones ( $\sim 100\sim 400$  nm de diámetro) y cuerpos multivesiculares, que apenas se encontraron en los terminales control. Una posible explicación a este fenómeno es la gran afectación del ciclo vesicular según el modelo clásico (Südhof, 1995), y por tanto la activación de otros mecanismos de reciclaje de membrana como por ejemplo *bulk-endocytosis* (Cousin, 2009).

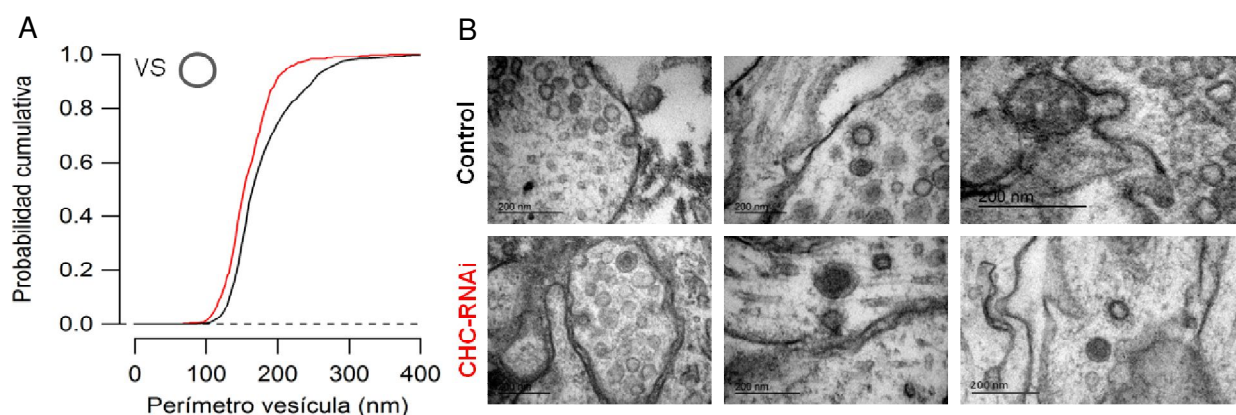
Ante la evidencia que las vesículas sinápticas disponían de mayor sensibilidad al cambio en los niveles de clatrina endógenos, se realizó un estudio minucioso tanto de su distribución como de sus dimensiones. La distribución de las vesículas por el citoplasma presináptico se cuantificó calculando la distancia de cada una de ellas a la porción de membrana plasmática más cercana. Como las imágenes de ultraestructura estaban en un solo plano y en algunos cortes no se definían las zonas activas, se consideró que ésta era el mejor método para estudiar la proximidad de las vesículas a los sitios putativos de liberación. A pesar de encontrar menos vesículas sinápticas cuando los niveles de clatrina eran reducidos, la

distribución de éstas fue similar entre terminales control y CHC-RNAi (Fig. R23). Puesto que cada distancia se contó desde el centro de la vesícula a la superficie plasmática más cercana, se consideró que las vesículas ancladas a la superficie eran las que se encontraban a  $\leq 50$  nm, puesto que el diámetro de las vesículas es de  $\sim 40$ -60 nm. Este resultado sugería que no se había alterado el equilibrio entre el RRP y los depósitos citoplasmáticos cuando los niveles de clatrina variaron, aunque sí el número de vesículas que los formaban.



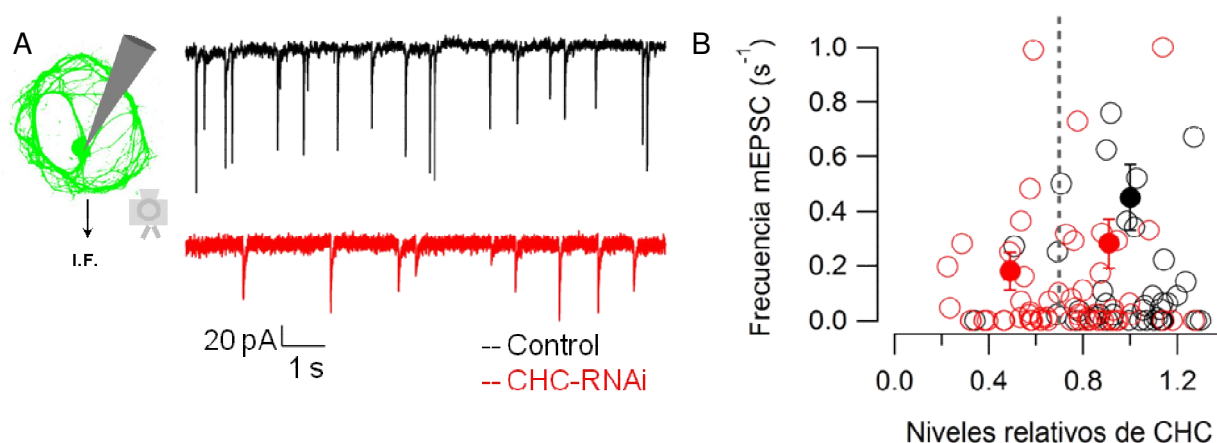
**Figura R23. Distribución de las vesículas sinápticas en el terminal presináptico.** Se calcula la distancia a la porción de membrana plasmática más cercana (D.M.M.C.) de cada vesícula. La distribución gaussiana es similar en terminales control (negro,  $n=2144$  vesículas) y CHC-RNAi (rojo,  $n=726$  vesículas), con preferencia entre 130-150 nm de distancia a la membrana. Por debajo de  $\leq 50$  nm se consideran a las vesículas ancladas a la membrana (línea punteada).

No sólo la cantidad de las vesículas sinápticas resultó afectada con la reducción de los niveles endógenos de clatrina, sino presumiblemente su *calidad*. Las diferencias en las dimensiones de las vesículas sinápticas sugirieron que el déficit de CHC afectó a su composición. Al contrario que con las LDCVs, las vesículas de los terminales CHC-RNAi eran  $\sim 5$ - $8$  nm de diámetro inferior a las de los terminales control ( $55.81 \pm 0.32$  nm, Fig. R24A). Una disminución así en el tamaño vesicular supondría una caída del volumen del  $\sim 25$ - $30\%$  y una consecuente reducción en el contenido de neurotransmisor. Una posible explicación a este fenómeno podría ser que las vesículas de neuronas CHC-RNAi fueran formadas por mecanismos no CME. Pero esta posibilidad quedó parcialmente descartada ya que se encontraron estructuras recubiertas de clatrina en los terminales CHC-RNAi (Fig. R24B) indicando que CME seguía participando en la endocitosis.



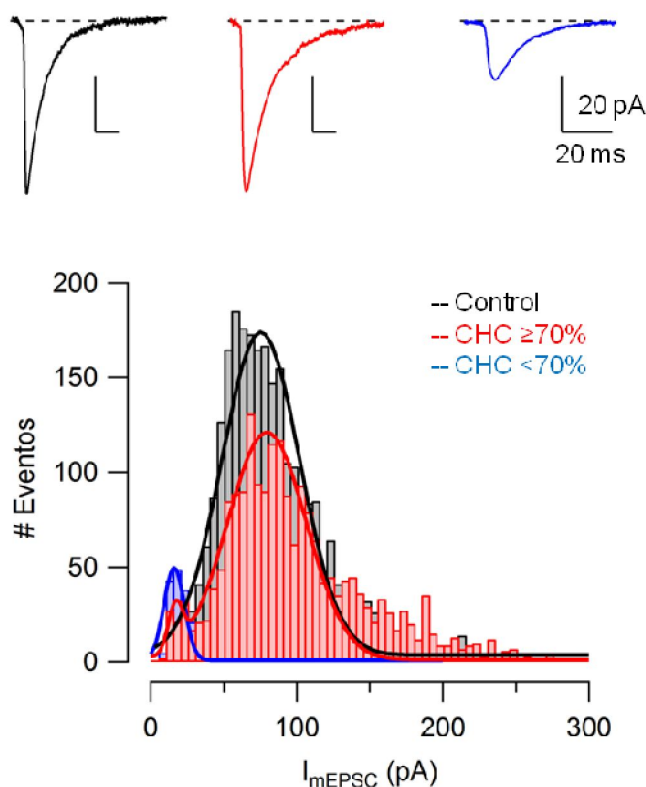
**Figura R24. La reducción de los niveles endógenos de CHC afecta a las dimensiones de las vesículas sinápticas.** A) Distribución acumulativa del perímetro de las vesículas sinápticas. Las vesículas sinápticas de terminales CHC-RNAi ( $n=726$  vesículas, rojo) tienen  $\sim 5\text{--}8$  nm menos de diámetro respecto al calculado en los controles ( $n=2144$  vesículas). B) Imágenes de microscopía electrónica que demuestran la formación de vesículas mediante el mecanismo de endocitosis mediada por clatrina tanto en condiciones control como en CHC-RNAi.

El efecto de la reducción de los niveles endógenos de clatrina en la cantidad y en el tamaño de las vesículas sinápticas se vio reflejado de forma funcional en la actividad espontánea de los SCMs. Se observaron diferencias tanto en la frecuencia (Fig. R25) como en la amplitud de los eventos cuantales (Fig. R26), entre ambas condiciones. En promedio, la frecuencia de mEPSCs de los controles ( $0.44 \pm 0.1$  mEPSC $\cdot$ s $^{-1}$ ) se vio reducida  $\sim 1.6$  veces en SCMs con niveles moderados de *knock-down* ( $0.28 \pm 0.1$  mEPSC $\cdot$ s $^{-1}$ ), y cayó más de la mitad cuando los niveles de CHC se redujeron  $>30\%$  ( $0.18 \pm 0.1$  mEPSC $\cdot$ s $^{-1}$ , Fig. R25B).



**Figura R25. La reducción de los niveles endógenos de clatrina afectan a la frecuencia de la neurotransmisión espontánea.** A) Ejemplos de registros de eventos espontáneos en las células CHC-RNAi y SCMs control. B) Variación de la frecuencia de mEPSCs en función de los niveles endógenos de clatrina. Los círculos abiertos corresponden a la frecuencia de cada célula. Los puntos indican la frecuencia promedio de células control (negro) y *knock-down* moderado e intenso (rojo) con el error estándar

La amplitud de los mEPSCs también resultó afectada en función de los niveles de CHC. En condiciones de intenso *knock-down* la amplitud del mEPSC se redujo ~80% (~14 pA) respecto del control (~72 pA). Pero en condiciones de *knock-down* moderado se encontraron dos poblaciones de mEPSCs, una con amplitud similar al control (~72 pA), y otra más reducida (~8% de los eventos) con una amplitud similar al *knock-down* moderado.

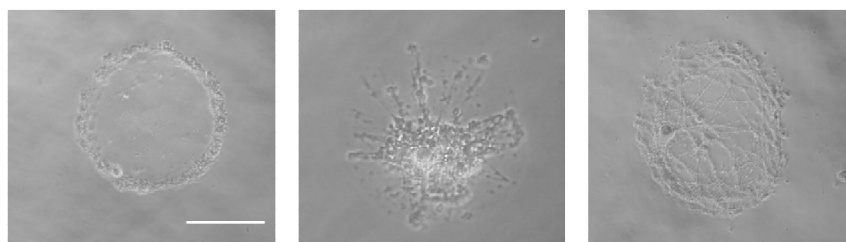


**Figura R26. La reducción de los niveles de endógenos de CHC afecta al tamaño cuantil.** Los trazos representan el mEPSC promedio registrado en las neuronas control (negro), con *knock-down* moderado (CHC ≥ 70%, rojo) o con intenso *knock-down* (CHC < 70%, azul). La distribución indica que cuando la clatrina cae de forma moderada, las neuronas presentan dos poblaciones de mEPSCs.

De los resultados anteriores se observa que la relación entre la disminución de la corriente cuantil (~80%) y el tamaño de la vesícula (~25~30%) cuando los niveles de clatrina se reducían intensamente no era 1:1. Desconocemos el motivo, aunque un déficit en la *calidad*, es decir, en el número de copias de proteínas vesiculares, como por ejemplo el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), podrían representar un déficit importante en el relleno de neurotransmisor.

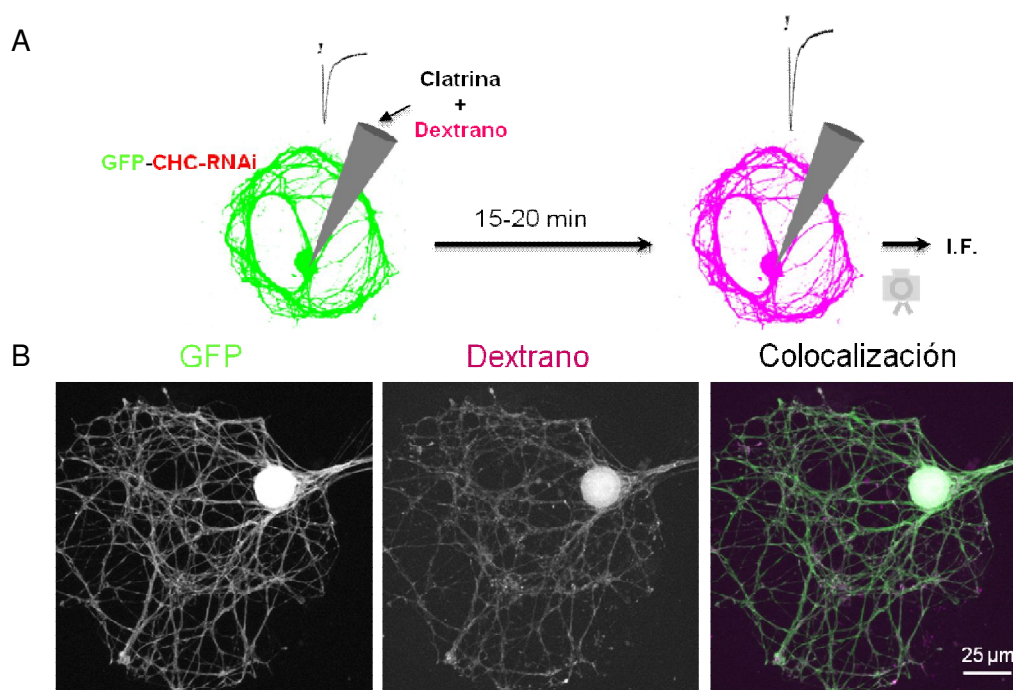
Para demostrar que los resultados obtenidos hasta el momento eran consecuencia de la reducción de los niveles endógenos de clatrina, se trató de rescatar el fenotipo en las neuronas CHC-RNAi mediante una segunda infección para sobreexpresar clatrina. La doble infección no tuvo éxito y causó la muerte de la mayoría de las neuronas y la imposibilidad de poder registrar las restantes, porque presentaban un aspecto apoptótico (Fig. R27).





**Figura R27. Los SCMs no soportan una doble infección.** Imágenes de SCMs doblemente infectados, con CHC-RNAi y mCherry-CHC aspecto apoptótico. Barra de calibración 150  $\mu$ m.

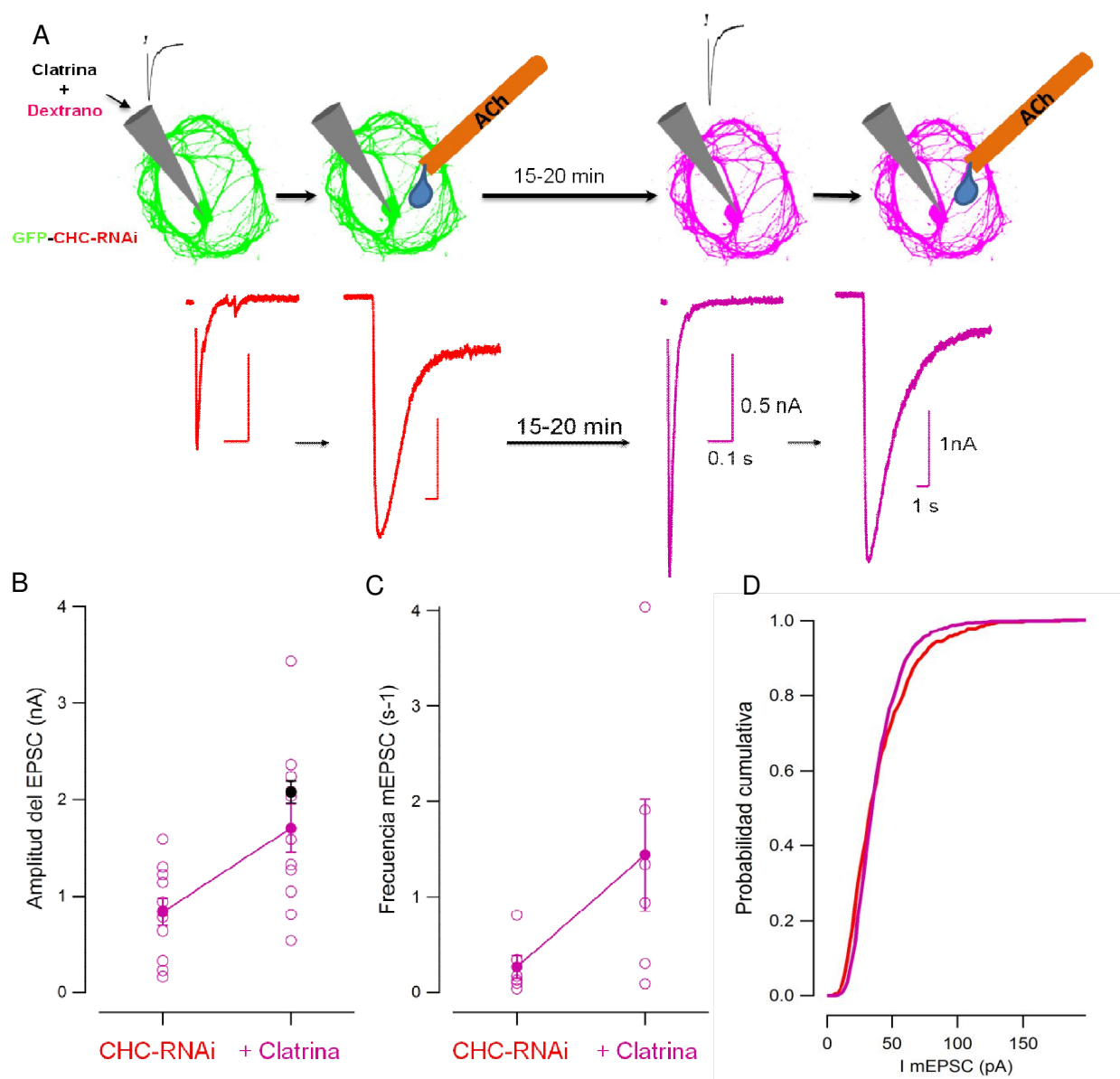
Así, se rescató el fenotipo de un modo alternativo. El Dr. Stephen J. Royle nos proporcionó clatrina purificada al 90% a partir de hígado de rata (Kaur et al., 2014). Tras su inclusión en la solución interna de registro, se dializó la proteína hacia el interior de la neurona, junto a una solución que contenía dextrano-*texas red* para asegurar que clatrina estaba llegando a los terminales presinápticos. Este colorante fluorescente tiene un peso molecular de 30 kDa, y clatrina de  $\sim$ 18 kDa. La fluorescencia del *texas red* colocalizada con la de proteínas sinápticas avalaba la llegada de clatrina a los terminales (Fig. 28B).



**Figura R28. La diálisis de clatrina exógena durante el registro alcanza las sinapsis.** A) Las neuronas CHC-RNAi son dializadas con clatrina 0.25 mM y dextrano-*Texas Red* 0.2 mM a través de la pipeta de registro. Se registra la respuesta evocada y espontánea inmediatamente tras romper la membrana de la célula y tras 15-20 min de diálisis se vuelve a registrar para conocer los cambios. Los SCMs registrados se preparan para microscopía confocal. B) Microscopía confocal de una neurona autáptica CHC-RNAi a la que se le ha dializado dextrano-*Texas Red* (magenta).

Inmediatamente después de establecer la configuración de *whole-cell* se registró la actividad evocada y espontánea. A continuación se dejó dializando la

solución de clatrina (0.25 mM) + dextrano (0.2 mM) durante 15-20 min, para volver a registrar (Fig. R28A). De esta forma, se estudió la reversibilidad de los cambios descritos como consecuencia del CHC-RNAi, en una misma neurona.

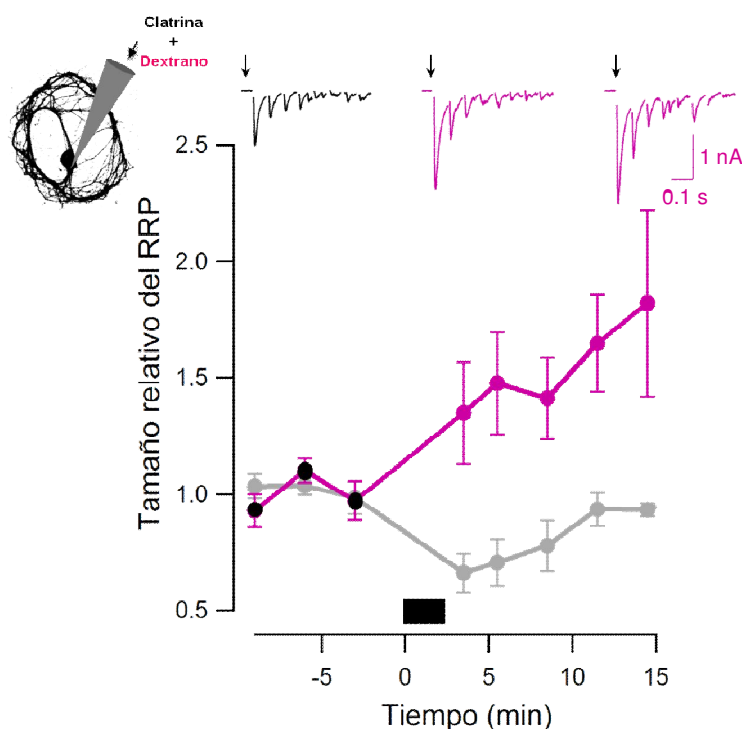


**Figura R29. Reversibilidad del efecto del CHC-RNAi mediante diálisis de clatrina exógena.** A) A las neuronas CHC-RNAi dializadas con 0.25 mM de clatrina se les aplica un pulso eléctrico y químico antes y después de la diálisis. Mientras la respuesta evocada por el estímulo eléctrico varía, no lo hace la evocada por la gota de 1 mM de ACh. B) Cambio promedio en la amplitud del EPSC evocado eléctricamente tras 20 min de diálisis de clatrina exógena. Los círculos abiertos representan los experimentos individuales (n=11). Los promedios (puntos magenta) se representan con el error estándar y se compara con el EPSC promedio de los SCM control (punto negro). C) Mismo estudio que (B) con la frecuencia de la actividad espontánea. D) No se observaron cambios en la amplitud de los mEPSC antes (rojo) y después de la diálisis (magenta).

Tras la diálisis se observó que: en promedio la amplitud del EPSC se incrementó 2.1 veces (Fig. R29A-B), de  $0.83 \pm 0.14$  nA antes de la diálisis a  $1.71 \pm 0.25$  nA después. Además, se comprobó que la reversibilidad observada era

principalmente de origen presináptico ya que la respuesta evocada químicamente por la aplicación local de una gota de ACh tanto al comienzo del *patch-clamp* como tras la diálisis de clatrina, no presentó ningún cambio (Fig. R29A). En promedio la frecuencia de eventos espontáneos se incrementó 7 veces de  $0.22 \pm 0.15 \text{ s}^{-1}$  a  $1.54 \pm 0.71 \text{ s}^{-1}$  con la diálisis de clatrina (Fig. R29C). Sin embargo, paradójicamente no se observó una variación en la amplitud de los mEPSCs tras la diálisis con clatrina exógena (Fig. R29D), ya que posiblemente era necesario más tiempo para rescatar este fenotipo. La diálisis con clatrina exógena tampoco indujo una respuesta en neuronas que no presentaban neurotransmisión. Es decir, no rescató sinapsis silentes.

Finalmente, observamos que los niveles de clatrina eran importantes para determinar la potencia sináptica y modificar la plasticidad a corto término. Así, nos preguntamos si la diálisis de clatrina exógena era capaz de modificar la plasticidad de las neuronas control no infectadas. Para ello se reprodujo la Fig. R7. Con la diálisis, la aplicación 3000 estímulos a 20 Hz, no sólo no redujo el tamaño del RRP sino que incluso se incrementó. La amplitud de los EPSCs evocados por el tren también aumentaron favoreciendo una menor depresión que la observada en condiciones control (Fig. R30).



**Figura R30. La diálisis de clatrina exógena evita la depresión con una alta actividad en neuronas control.** La diálisis de clatrina exógena evita la depresión sináptica observada en neuronas control con un tren de 3000 estímulos a 20 Hz (barra, n=7). Compárese con la Fig. R7 (gris).

## 2.4. RELEVANCIA DE LOS NIVELES DE CLATRINA EN LA NEUROTRANSMISIÓN.

Nuestros resultados demuestran que durante períodos de intensa actividad los niveles presinápticos de clatrina se ven reducidos transitoriamente, ya que la proteína soluble se mueve hacia las regiones perisinápticas. Esta reducción depende de la probabilidad de liberación a la que opere el terminal. Pero la caída de clatrina en el terminal observada durante la estimulación está subestimada, ya que parte de la proteína que permanece en el terminal se dedica a formar jaulas y no está disponible. Haciendo una equivalencia con los resultados obtenidos con la manipulación experimental de los niveles de clatrina mediante RNAi, podemos deducir que un *knock-down* transitorio de esta proteína podría alterar tanto el tamaño cuantal como la respuesta evocada, favoreciendo la depresión observada durante la estimulación. En la siguiente tabla se exponen los datos relevantes que resultan afectados con la variación de los niveles endógenos de clatrina en el terminal presináptico.

<b>*Efectos de la alta estimulación sobre la neurotransmisión</b>				
<b>Parámetro</b>	<b>Control</b>	<b>Inmediatamente tras 3000 estímulos a 20 Hz</b>		<b>Fig.</b>
Amplitud mEPSC	57.9±2.63	47.2±3.71*		R6
Tamaño RRP (nA)	7.99±0.7	4.68±0.6*		R7
<b>*Efectos de los niveles endógenos de clatrina (CHC) sobre la neurotransmisión</b>				
<b>Parámetro</b>	<b>Control (GFP)</b>	<b><i>Knock-down</i> moderado, CHC&gt;70%</b>	<b><i>Knock-down</i> intenso, CHC&gt;70%</b>	<b>Fig.</b>
Amplitud EPSC (nA)	≥2	1<EPSC<2	<1*	R16
PPR 1s	~1	~0.85	~0.75*	R17
Tamaño RRP (nA)	4.32±0.58	2.21±0.46*	1.39±0.32*	R19
Tamaño RRP (pC)	447±50	179±29*	134±22*	R19
Vesículas en RRP	~70-220	~41-90*	~22-67*	
Frecuencia mEPSC (s <sup>-1</sup> )	0.44±0.10	0.28±0.11*	0.18±0.10*	R25
Amplitud mEPSC (pA)	~72	~72 (92% de eventos) ~14 (8% de eventos)	~14*	R26
Área terminal presináptico (µm <sup>2</sup> )	0.68±0.07	0.90±0.02		

Densidad vesículas sinápticas ( $\mu\text{m}^{-2}$ )	86.7 $\pm$ 7.3	51.3 $\pm$ 8.4*	R22
Diámetro vesículas sinápticas (nm)	55.81 $\pm$ 0.32	48.1 $\pm$ 0.44*	R24
Densidad LDCV ( $\mu\text{m}^{-2}$ )	2.6 $\pm$ 1.0	4.8 $\pm$ 1.2	R22
Diámetro LDCV (nm)	94.70 $\pm$ 2.24	97.08 $\pm$ 2.62	R22

**Tabla R2. Parámetros funcionales en función de los niveles endógenos de clatrina.** Los datos significativos se indican con asterisco.

De los experimentos de rescate, se puede estimar la concentración aproximada de clatrina en los terminales presinápticos. Considerando que se dializa  $\sim$ 0.25 mM de clatrina purificada, y que los axones presentan una elevada tortuosidad a pesar de la alta difusión de la proteína, es improbable que la concentración de clatrina presináptica sea  $>0.1$ -0.2 mM. Por lo tanto, una reducción del  $\sim$ 20% de los niveles endógenos de la proteína suponen 10-100  $\mu\text{M}$ .

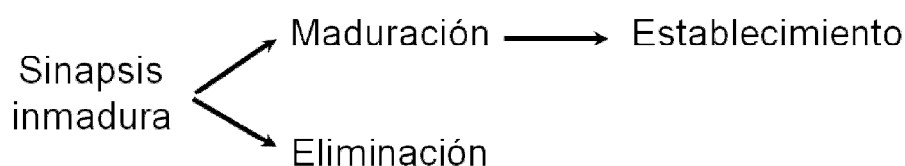
En conclusión, se demuestra que clatrina ejerce un papel altamente cooperativo en la endocitosis, pues pequeñas variaciones en los niveles disponibles de la proteína generan grandes cambios en la neurotransmisión, y por tanto es un factor limitante de la plasticidad a corto término de sinapsis maduras. Si dicha sensibilidad varía durante el desarrollo, es una cuestión que queda abierta para ser estudiada en un futuro.

### 3. EFECTOS DE LA PROTEÍNA SPARC SOBRE LA MADURACIÓN SINÁPTICA.

Hasta ahora en esta tesis se han estudiado los cambios funcionales que se producen en las sinapsis colinérgicas desde que comienzan a operar con un fenotipo inmaduro hasta que alcanzan la madurez.

Una sinapsis madura es capaz de mantener una plasticidad determinada que le permite sostener la neurotransmisión bajo una actividad moderada. En estas condiciones, la endocitosis puede balancear a la exocitosis y equilibrar los depósitos de vesículas sinápticas (Denker & Rizzoli, 2010). Pero frente a una intensa actividad la endocitosis se convierte en la etapa limitante porque no es capaz de compensar la elevada exocitosis (Balaji et al., 2008), y la neurotransmisión se deprime. Estos cambios afectan principalmente al terminal presináptico y la clatrina juega un papel importante en este fenómeno (capítulo 2 de resultados).

Las sinapsis inmaduras presentan un fenotipo de depresión incluso en condiciones moderadas de actividad, debido a que contienen unos depósitos reducidos de vesículas sinápticas (Mozhayeva et al., 2002), y una alta probabilidad de liberación (Feldmeyer & Radnikow, 2009). Como la endocitosis es la encargada de formar y mantener los depósitos, se sugiere que este mecanismo se encuentra regulado durante el desarrollo (Saheki & De Camilli, 2012). Sin embargo no se conocen qué factores ejercen este control. El papel central de la endocitosis durante el desarrollo es también evidente en refinamiento sináptico, en el que algunas sinapsis serán eliminadas. Las sinapsis más inmaduras son las que presentan mayor disposición a ser eliminadas, y fenómenos relacionados con la endocitosis de las membranas juegan un papel importante en el proceso (ver introducción):



Las células gliales participan en los procesos de maduración y eliminación. Se conocen algunos de los factores liberados por la glía que favorecen la formación de contactos sinápticos, como trombospondina 1, glipicanos, colesterol o hevin (Allen, 2013). Sin embargo, otros factores de origen glial antagonizan el efecto sinaptogénico, sugiriendo un equilibrio entre proteínas para refinar el sistema. Este

es el caso de SPARC, que compite con la acción sinaptogénica de hevin (Kucukdereli et al., 2011).

Como han demostrado algunos trabajos, los contactos sinápticos que van a eliminarse presentan una reducción de su potencia (Colman, Nabekura, & Lichtman, 1997) y un fenotipo depresivo (Wiegert & Oertner, 2013). Ambas características son propias de sinapsis inmaduras. De esta forma las mismas moléculas que antagonizan la sinaptogénesis o la madurez podrían ser las responsables de la eliminación sináptica.

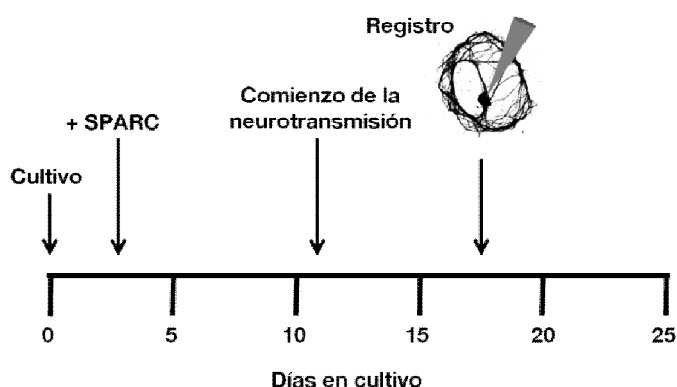
Los resultados del capítulo 1 de esta tesis demuestran que la maduración de las sinapsis colinérgicas *in vitro*, se produce en ausencia de glía, y por tanto de cualquier factor secretado por estas células, a excepción del NGF (*nerve growth factor*) que es necesario para el mantenimiento de estos cultivos (Crowley et al., 1994; Perez-Gonzalez et al., 2008). Estas observaciones presentan a la maduración como un proceso autónomo de la neurona. Además, el número de contactos sinápticos en un SCMs es similar entre las etapas de inmadurez y de madurez (Albrecht et al., 2012). Consecuentemente, el mantenimiento de un fenotipo inmaduro o el inicio de un proceso de eliminación sináptica es muy probable que requiera la participación de factores aportados por otros tipos celulares.

En anteriores trabajos en el laboratorio se había demostrado que SPARC, una proteína matricelular liberada por la glía, cuando se aplicaba a bajas concentraciones (2.5-5 nM) *in vitro* arrestaba a los terminales presinápticos colinérgicos en un estado de inmadurez. Se caracterizaba por una reducción de los depósitos de vesículas y un aumento de la depresión sináptica (Albrecht et al., 2012). Esta propiedad hacía a SPARC susceptible de ser estudiada durante el desarrollo. Así, tras mi incorporación al laboratorio comencé a contribuir en la caracterización del efecto que esta proteína generaba en la neurotransmisión, estudiando más profundamente los fenómenos de depresión observados en los SCMs tratados y sus consecuencias.

### **3.1. EFECTOS DE LA CONCENTRACIÓN DE SPARC SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN.**

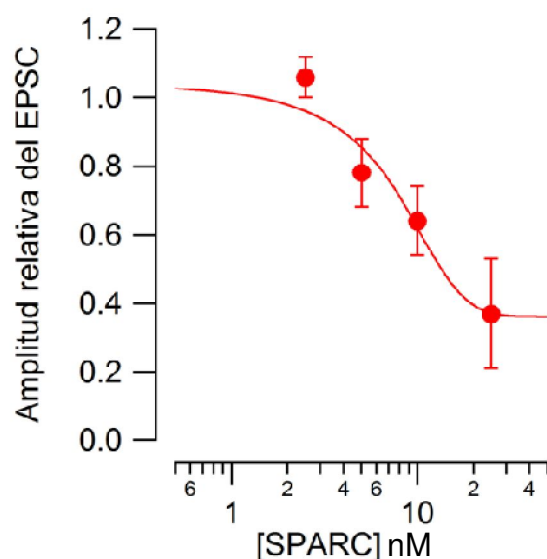
Los SCMs son un modelo excelente, para estudiar el efecto de factores secretados por la glía sobre la neurotransmisión. Simplemente ajustando la

composición del medio de cultivo, es posible investigar la función de moléculas de origen glial. Para conocer el papel de SPARC, se añadió de forma crónica la proteína recombinante a diferentes concentraciones. Asumiendo que la madurez sináptica aparece a partir de 16 D.I.V. (tabla R1, capítulo 1 resultados), se compararon las neuronas tratadas con SPARC, con aquellas crecidas en ausencia de la proteína, consideradas neuronas control (Fig. R31).



**Figura R31. Tratamiento crónico de SPARC.** El día de la siembra del cultivo se considera el día 0 *in vitro*. La proteína SPARC se añade en el primer cambio de medio realizado a los 2-3 D.I.V. La neurotransmisión comienza a los ~12 D.I.V. y los registros de los SCMs se realizan  $\geq 16$  D.I.V.

El desarrollo de los SCMs en concentraciones variables de SPARC demostró que esta proteína ejercía un efecto sobre la neurotransmisión dependiente de la concentración. La relación entre la concentración de SPARC y la respuesta sináptica evocada se ajustó a una función sigmoideal, en la que la amplitud del EPSC decrecía en función de la concentración de SPARC. Mientras que los SCMs tratados de forma crónica con 2.5-5 nM de SPARC no presentaron apenas una reducción del EPSC, en neuronas incubadas con 25 nM de la proteína sufrieron una disminución del ~63% en la amplitud del EPSC, comparados con las neuronas control (Fig. R32).

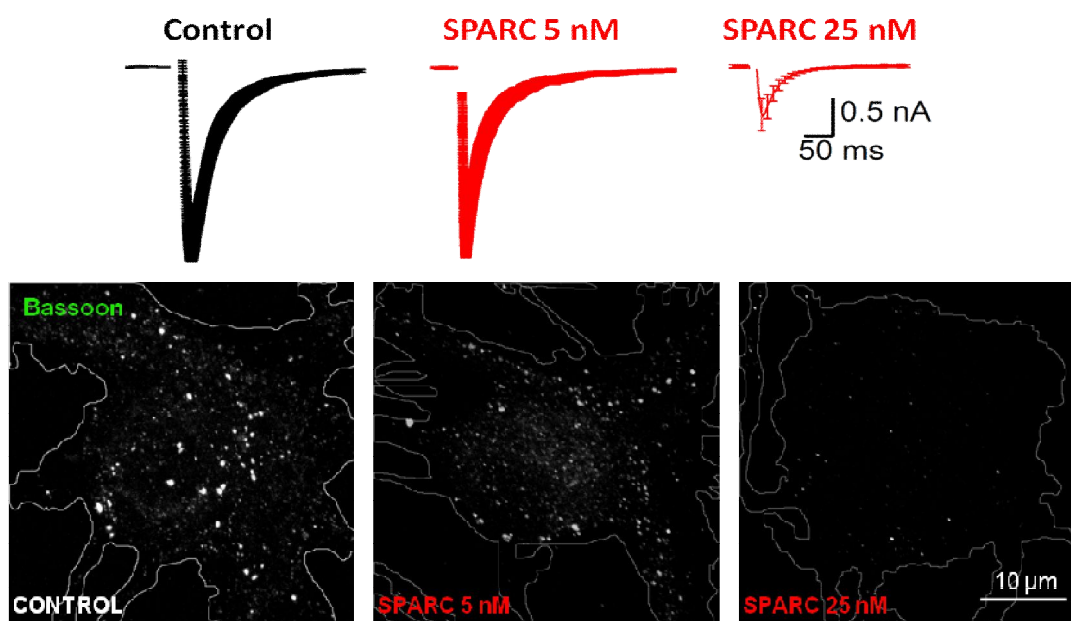


**Figura R32. El efecto de SPARC sobre la neurotransmisión es dosis-dependiente.** Se representa la relación entre la concentración de SPARC y la amplitud promedio del EPSC relativa a los controles ( $n=63$  SCMs tratados). La función sigmoideal revela que  $[SPARC]_{50} \sim 13$  nM. Las barras indican el error estándar.



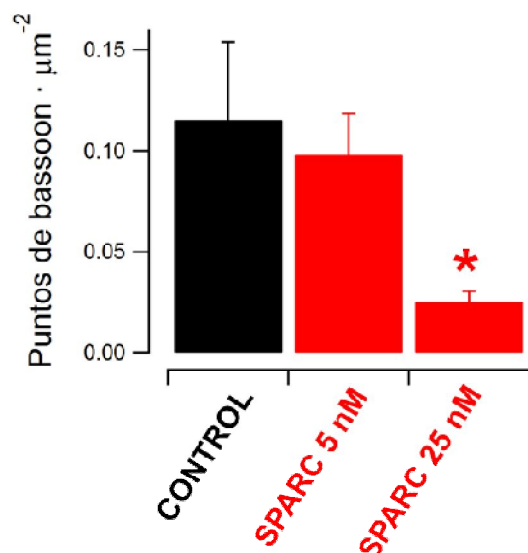
La fuerte reducción del EPSC en función de la concentración de SPARC, sugirió la posible disminución de los contactos sinápticos. Utilizamos bassoon como marcador presináptico (Zhang & Benson, 2001), ya que es un buen indicador de zonas activas y permite realizar una estimación del número de sinapsis funcionales (Albrecht et al., 2012).

El análisis correlativo de los SCMs registrados con inmunofluorescencia para bassoon (Fig. R33), determinó que SPARC, reducía el número de contactos sinápticos en una manera dosis-dependiente.



**Figura R33. SPARC disminuye la amplitud del EPSC reduciendo el número de contactos sinápticos.** Los trazos representan el EPSC promedio de 40 neuronas control y de SCMs incubados de forma crónica con 5 nM (n=16) y 25 nM (n=11) de SPARC. Las barras representan el error estándar. Las imágenes muestran ejemplos de la disminución del número de puntos de bassoon por unidad de superficie a 25 nM de SPARC.

Mientras que el número de sinapsis no se vio alterado a bajas concentraciones de la proteína, el tratamiento crónico con 25 nM de SPARC redujo un ~78% la densidad de puntos de bassoon en el soma celular ( $0.03 \pm 0.01 \mu\text{m}^{-2}$ ) respecto de los SCMs control ( $0.12 \pm 0.04 \mu\text{m}^{-2}$ , Fig. R34).

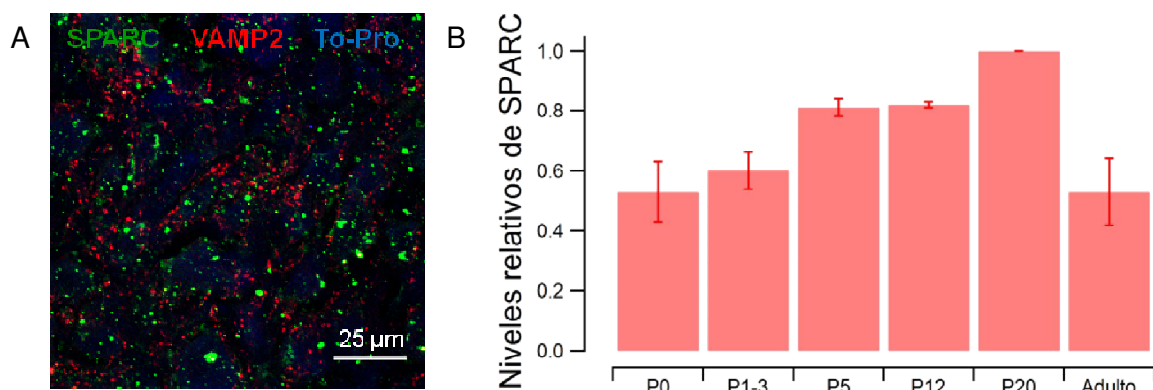


**Figura R34. SPARC reduce la densidad de sinapsis colinérgicas de una forma dosis-dependiente.** Valores promedio del número de puntos de bassoon por unidad de superficie en torno al soma celular, en SCMs control (n=14), 5 nM de SPARC (n=10) y 25 nM de SPARC (n=6). Las barras indican el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas ( $p < 0.001$ ).

Considerando que concentraciones de SPARC entre 2.5 y 5 nM, arrestan los terminales presinápticos en un fenotipo inmaduro (Albrecht et al., 2012), la curva dosis-respuesta sugería un doble rol a la proteína. A bajas concentraciones SPARC afectaba a la respuesta sináptica, sin alterar el número de sinapsis, y a altas concentraciones esta proteína reducía la neurotransmisión porque disminuía el número de contactos sinápticos.

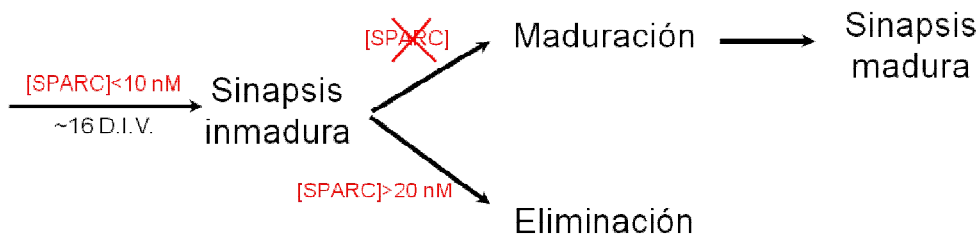
Para validar la posible implicación de SPARC en la eliminación sináptica, analizamos la expresión de la proteína *in vivo* y su implicación en el desarrollo de las sinapsis. SPARC es secretada por las células gliales durante el desarrollo tanto en el sistema nervioso central como periférico, y resulta disminuida con la madurez (Vincent, et al., 2008). A pesar de que regula la organización de la matriz extracelular (MEC) y las interacciones entre las células y la MEC (Murphy-Ullrich & Sage, 2014), su aparición durante el desarrollo del sistema nervioso y después de que éste sufre un daño, le habían sugerido un papel en la neurogénesis y en la plasticidad sináptica (Au et al., 2007).

El análisis de la ventana de expresión de SPARC en el SCG de rata (de donde se extraen las neuronas para establecer los SCMs) mostró un pico a los ~20 días (Fig. R35B) coincidente con el período de eliminación sináptica durante el refinamiento en el ganglio nervioso (Heath et al., 1992). Este experimento se hizo en colaboración con la Dra. Beatrice Terni quien realizó el *western-blot* y cuantificó los niveles de la proteína. Imágenes de inmunofluorescencia mostraron que la proteína se disponía alrededor de las sinapsis de las neuronas del SCG (Fig. R35A).



**Figura R35. SPARC se expresa en SCG durante el período del refinamiento sináptico.** A) Inmunofluorescencia del SCG a P15. B) Niveles relativos de expresión de SPARC en el SCG a diferentes días postnatales desde P0 hasta 2 años (adulto, n=3 geles). Obsérvese un pico de expresión a las ~3 semanas del nacimiento.

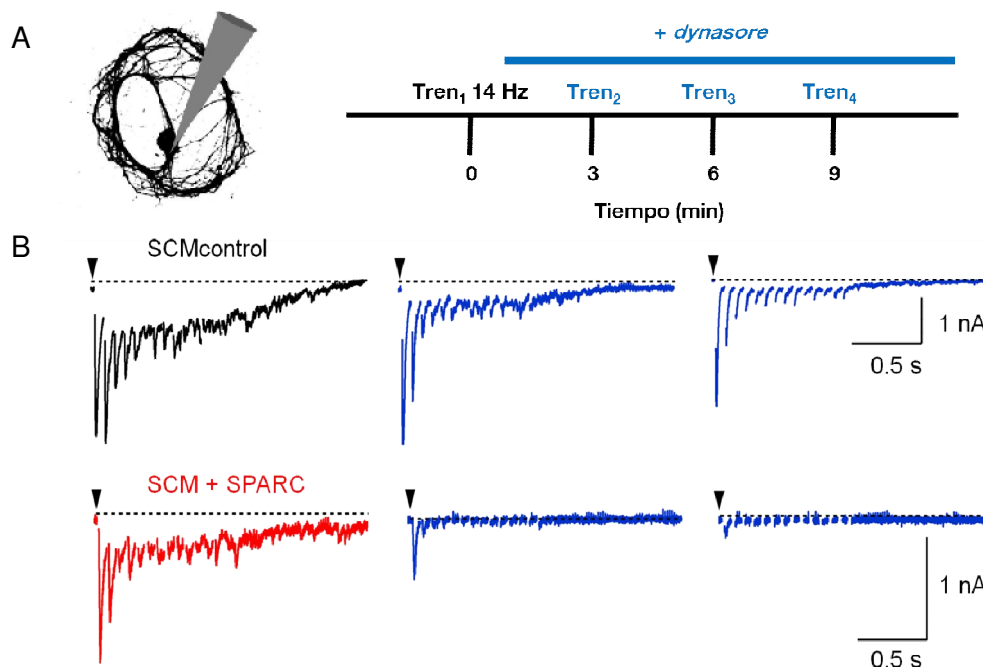
El significado funcional de un pico de SPARC podría ser el "marcaje" de las sinapsis para su eliminación, de acuerdo con el siguiente modelo:



### 3.2. EFECTOS DE SPARC SOBRE LA INMADUREZ SINÁPTICA.

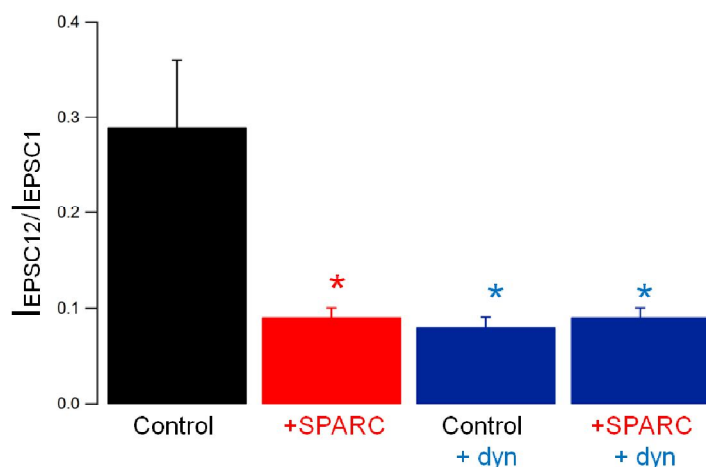
Una concentración crónica de 2.5-5 nM de SPARC, arrestaba a las sinapsis en un estado de inmadurez (Albrecht et al., 2012). Los experimentos para caracterizar el efecto de SPARC sobre la inmadurez fueron realizados en paralelo con el Dr. David Albrecht. Las características principales, comparadas con los controles, fueron: *i*) elevada probabilidad de liberación; *ii*) ~30% de depresión sináptica, cuando se aplicaba el protocolo de pulsos pareados; *iii*) fuerte depresión sináptica frente a un tren de estímulos a 14 Hz y 2 mM  $[Ca^{+2}]_{ext}$ . (Fig. R36). El fenotipo observado con SPARC recordó al de neuronas inmaduras en los primeros días tras el comienzo de la neurotransmisión (Fig. R36, trazo rojo. Compárese con la Fig. R5  $\leq 15$  D.I.V.); *iv*) Reducción del número de vesículas citoplasmáticas. Como los fenómenos de depresión están relacionados con el tamaño de los depósitos de vesículas, se comparó su agotamiento mediante el uso de *dynasore*, un inhibidor de dinamina que bloquea la endocitosis y evita el rellenado de los depósitos tras la exocitosis (Chung et al., 2010). Los SCMs tratados con SPARC liberaron toda la carga cuantales en un

primer tren de estimulación mientras que los controles "resistieron" mejor la estimulación sostenida y presentaron respuesta a más de tres trenes de estímulos. (Fig. R36).



**Figura R36. Los SCMs tratados con SPARC presentan un depósito de liberación de vesículas más reducido.** A) Experimento para evaluar el efecto de *dynasore* (azul) sobre los depósitos de vesículas sinápticas, aplicando trenes de estímulos a 14 Hz cada tres minutos. B) Ejemplos de registros de los EPSCs. Para cada condición los trazos corresponden al Tren1, Tren2 y Tren4. Obsérvese la acentuada depresión y el casi completo vaciamiento en el caso de SPARC tras el Tren1.

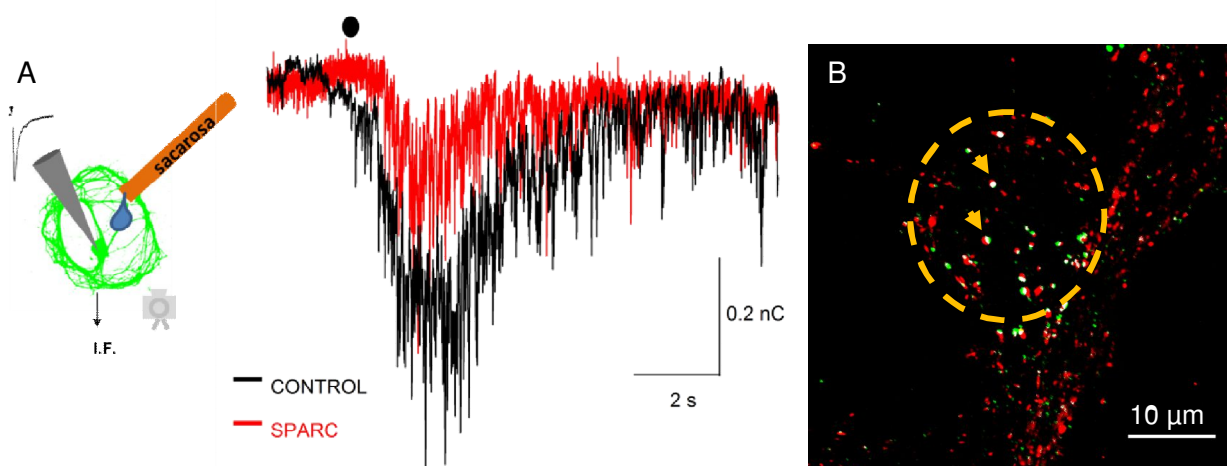
Para cuantificar el grado de depresión generado por los trenes de estimulación de la Fig. R36, se relacionó el EPSC<sub>12</sub> evocado de cada tren con el EPSC<sub>1</sub>, en ausencia y en presencia de *dynasore* (Fig. R37). Las neuronas tratadas con SPARC presentaron una depresión similar a los controles cuando éstos están en presencia del inhibidor de endocitosis.



**Figura R37. SPARC favorece la depresión sináptica reduciendo el tamaño de los depósitos de vesículas.** Relación de la amplitud de las corrientes EPSC<sub>12</sub> y EPSC<sub>1</sub> del Tren1 ( $0.29 \pm 0.07$ ,  $n=17$  células control; y  $0.09 \pm 0.01$ ,  $n=25$  células SPARC) y del Tren4 ( $0.08 \pm 0.01$  SCMs control y  $0.09 \pm 0.01$  SCMs SPARC). El asterisco indica la diferencia significativa ( $p < 0.01$ ).

v) Reducción del tamaño del RRP. Tras observar que SPARC ejercía una reducción global de la cantidad de vesículas sinápticas del terminal, se trató de averiguar cómo afectaba al RRP. Para cuantificarlo se probaron tres métodos clásicos: aplicación local de una solución hiperosmótica (Rosenmund & Stevens, 1996), tren de estímulos a alta frecuencia (Schneppenburger et al., 1999) y estudio de la ultraestructura mediante microscopía electrónica. Yo realicé el primer método y los otros dos fueron desarrollados por el Dr. David Albrecht (Albrecht et al., 2012).

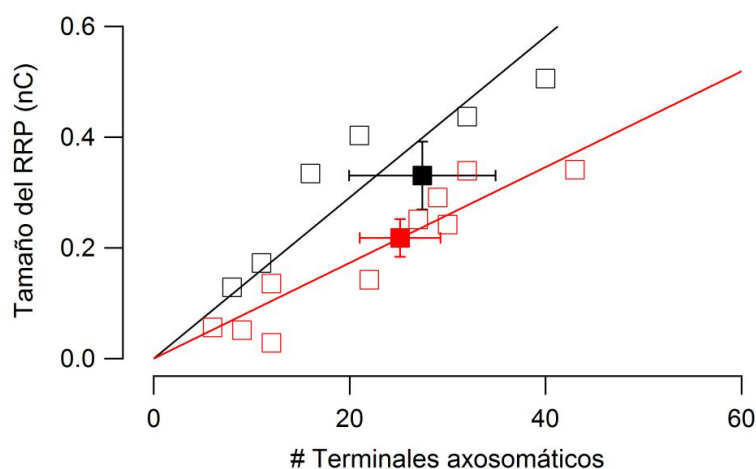
La estimación del RRP mediante la aplicación local de una solución hiperosmótica, se correlacionó con el número de sinapsis axosomáticas funcionales, que son las que contribuyen principalmente en la respuesta evocada. Debido a las limitaciones de *space-clamp* (ver materiales y métodos) la contribución de sinapsis axodendríticas alejadas del soma es prácticamente nula. La sinapsis fueron cuantificadas por inmunofluorescencia como puntos de colocalización de bassoon (zona activa) y sinaptofisina (depósitos de vesículas, Fig. R38).



**Figura R38. SPARC a baja concentración reduce el tamaño del RRP pero mantiene el número de contactos axosomáticos.** A) Estimación del RRP mediante una gota de sacarosa 500 mOsm/kg durante 2 s. Los SCMs son tratados con TTX 20 nM 24-36 h antes del registro para evitar pérdida del RRP con actividad espontánea. Obsérvese la reducida carga del RRP en las células tratadas con 2.5-5 nM SPARC. B) Estimación de los contactos axosomáticos funcionales (flechas amarillas) como puntos de colocalización de bassoon y sinaptofisina, que se encuentran delimitadas dentro del soma de la neurona (línea discontinua amarilla).

Los SCMs tratados con 2.5-5 nM SPARC presentaron un número similar de contactos axosomáticos ( $25 \pm 4$  sinapsis,  $n=10$  neuronas) que los controles ( $27 \pm 7$  sinapsis,  $n=6$ ). Pero el tamaño del RRP con SPARC se vio significativamente reducido, pasando de  $390 \pm 47$  pC en los controles a  $182 \pm 36$  pC en las neuronas tratadas ( $p < 0.01$ , Fig. R39). Relacionando estos resultados con los obtenidos por los

otros métodos de estimación, se determinó que un terminal control contaba con ~4~9 vesículas en el RRP, frente a ~2~6 vesículas en terminales tratados con 2.5 o 5 nM de SPARC (Albrecht et al., 2012).



**Figura R39. Efecto de SPARC sobre el tamaño del RRP.** Estimación del tamaño del RRP por contacto sináptico. Para cada célula se representa el tamaño del RRP y el número de contactos axosomáticos (círculos abiertos). Los valores individuales se ajustan a una función lineal. Las pendientes indican la carga del RRP de un único terminal control (14.8 pC) y uno tratado (8.6 pC). Los valores promedio para cada condición se representan con el error estándar.

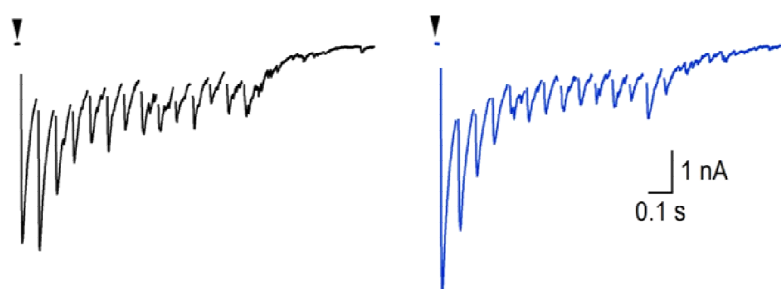
En resumen, los resultados demuestran que los efectos de SPARC son principalmente sobre el terminal presináptico. El tratamiento crónico con la proteína a baja concentración redujo 2 veces el número de vesículas sinápticas, en neuronas  $\geq 16$  D.I.V., favoreciendo la depresión sináptica observada (Albrecht et al., 2012).

A continuación se investigaron los mecanismos usados por SPARC para actuar sobre la inmadurez en el terminal presináptico. SPARC actúa sobre el citoesqueleto de actina de células no neurales (Bhoopathi et al., 2011). Como clásicamente los microfilamentos de actina se han involucrado en el ciclo de las vesículas sinápticas (Morales et al., 2000) y en los cambios plásticos producidos durante la maduración (Zhang & Benson, 2002), se estudió si SPARC ejercía un efecto sobre este elemento estructural.

### 3.2.1. Efecto de SPARC sobre el citoesqueleto de actina.

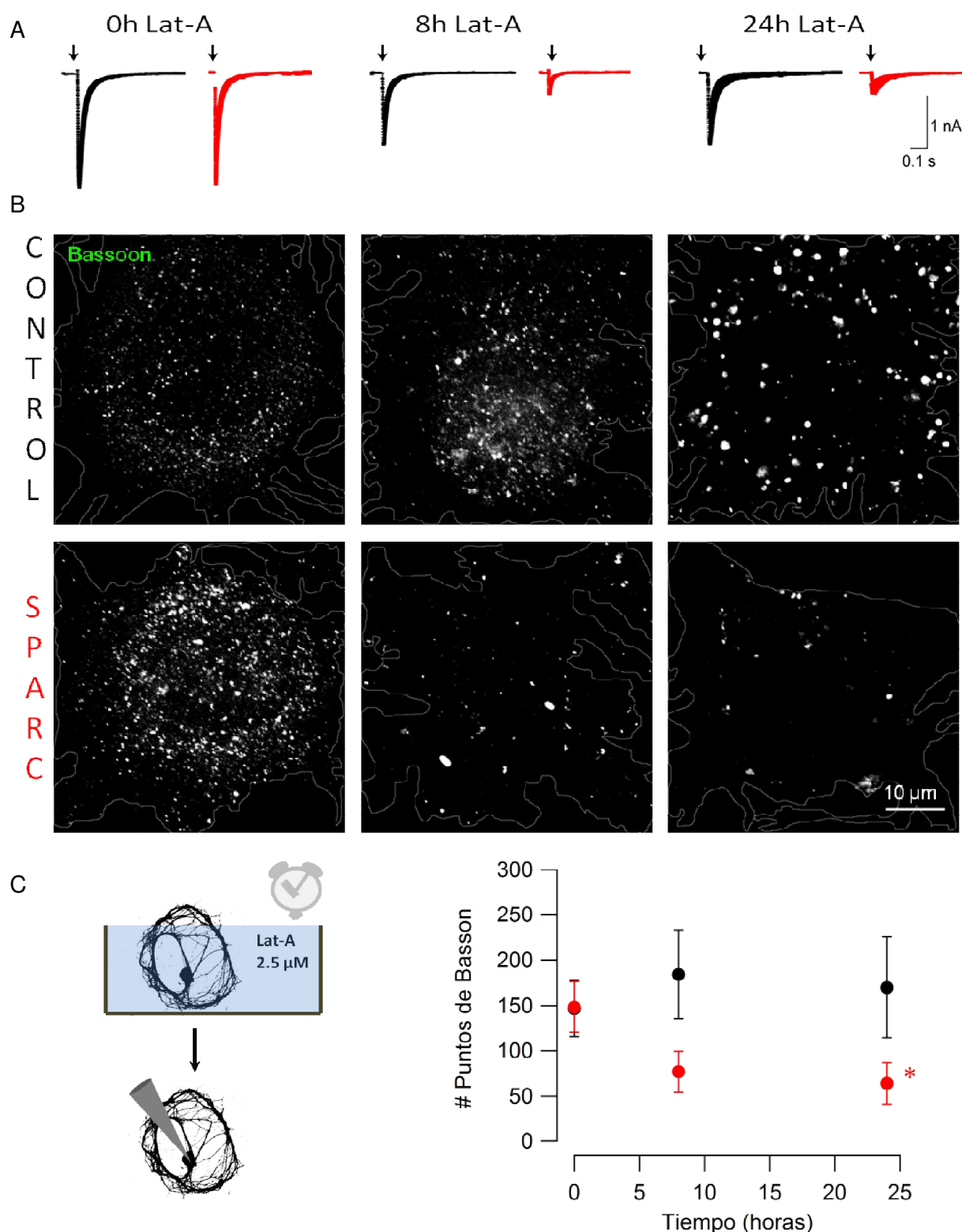
Usamos el fármaco latrunculina-A (Lat-A), un agente que promueve la despolimerización de los filamentos de actina, causando efectos a nivel sináptico (Bourne, Morgan, & Pieribone, 2006; Morales, Colicos, & Goda, 2000; Zhang &

Benson, 2001). La aplicación de Lat-A a los SCMs incrementó la Pr y favoreció la depresión sináptica (Fig. R40).



**Figura R40. Efecto de Lat-A sobre un SCM control.** Registro evocado por un tren a 14 Hz y 2 mM  $[Ca^{2+}]_{ext}$ , antes (negro) y tras 3 min en presencia Lat-A 20  $\mu$ M (azul). En la neurona control, Lat-A favorece un incremento de los primeros EPSCs evocados por el tren (aumento de la probabilidad de liberación) y una marcada depresión en los consecutivos.

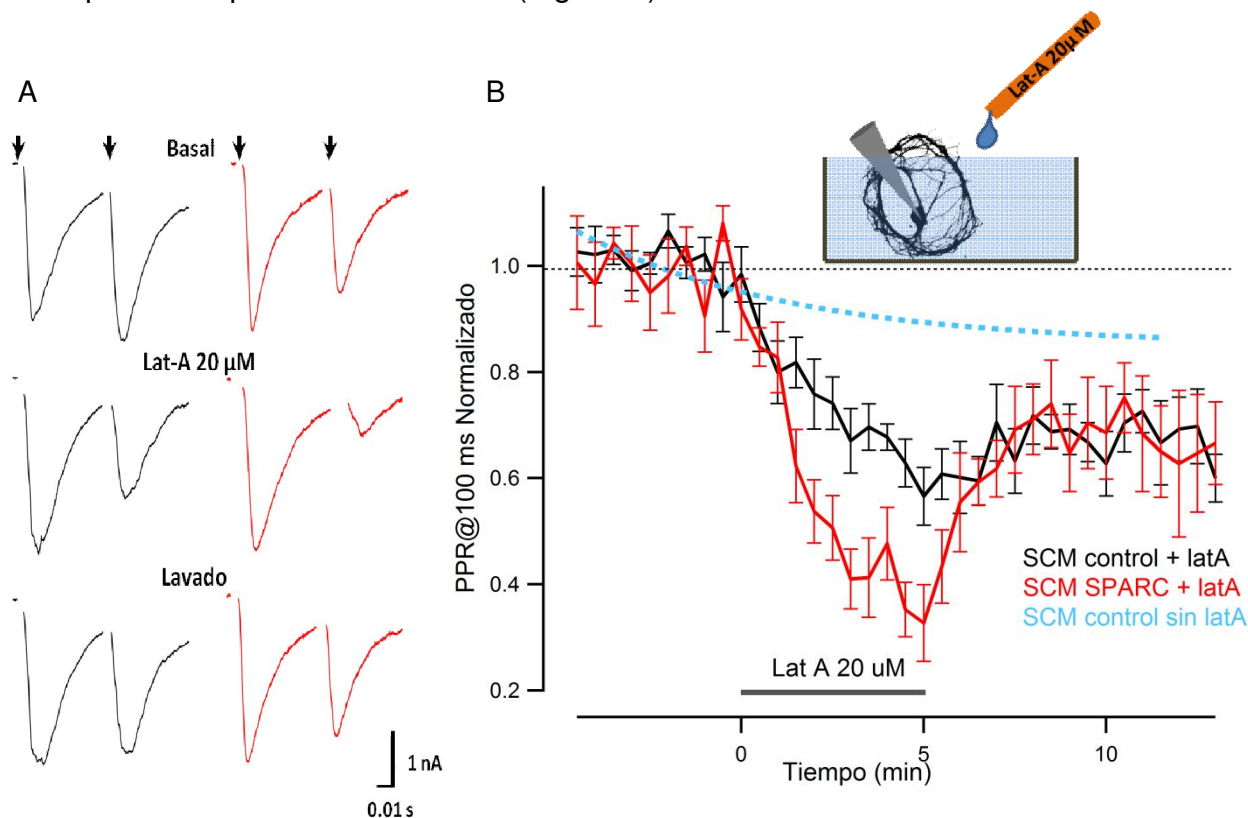
El análisis funcional de los SCMs tratados con 2.5  $\mu$ M Lat-A durante a 24 h, resultó en una caída del ~80% en el EPSC evocado de las neuronas del grupo experimental SPARC (de  $2.20 \pm 0.22$  nA a  $0.35 \pm 0.12$  nA antes y después del tratamiento), mientras que los controles sufrieron una menor depresión (de  $2.63 \pm 0.36$  nA a  $1.16 \pm 0.23$  nA, Fig. R41A). La caída del EPSC fue acompañada de una reducción en el número de sinapsis axosomáticas observada con el marcaje correlativo de la proteína bassoon (Fig. R41B y C). Estos resultados coincidieron con observaciones obtenidas en neuronas de hipocampo en las primeras etapas del desarrollo (Zhang & Benson, 2001).



**Figura R41. SPARC favorece una reducción de sinapsis y una caída de la neurotransmisión en presencia de Lat-A.** A) El tratamiento durante 24 h con 2.5  $\mu$ M Lat-A reduce en ~80% el EPSC promedio de las neuronas SPARC (n=14, 9 y 9 SCMs a 0, 8 y 24 h de Lat-A). Esta reducción es menor en los controles (n=15, 8 y 7 SCMs a 0, 8 y 24 h de lat-A). B) Inmunofluorescencia correlativa de los SCMs tratados con Lat-A en los tiempos de (A). Se cuantifican los puntos de bassoon principalmente centrados en el soma (perfil de la célula). Obsérvese la fuerte reducción de las sinapsis en SCMs desarrollados en 2.5 nM SPARC tratados  $\geq$ 8h con 2.5 $\mu$ M lat-A. C) Puntos de bassoon promedio en función del tiempo de tratamiento con 2.5  $\mu$ M de lat-A. ( $p < 0.01$ ).



Paralelamente, la aplicación aguda de 20  $\mu\text{M}$  de lat-A generó una marcada depresión a corto plazo de los SCMs desarrollados con 5 nM SPARC frente a los controles. Los efectos de lat-A fueron transitorios, de modo similar a las neuronas de hipocampo (Morales et al., 2000). El aumento de la depresión vino favorecida por un incremento de la Pr y una fuerte reducción del *paired-pulse ratio* a 100 ms, cuando se aplicaba el protocolo a 0.03 Hz (Fig. R42).



**Figura R42. SPARC potencia el efecto agudo de la lat-A sobre la plasticidad sináptica.** A) EPSCs evocados por pulsos pareados con intervalo de 100 ms (flechas), antes, durante y después de la aplicación aguda de 20  $\mu\text{M}$  lat-A. Los SCMs desarrollados en presencia de SPARC parten de una depresión que se ve incrementada con la lat-A, indicando mayor sensibilidad a esta droga. B) Curso temporal promedio de los *paired pulse ratio*, PPR@100 ms, aplicados a 0.03 Hz antes, durante y después de la presencia de 20  $\mu\text{M}$  lat-A, y relativa a los valores basales. En presencia de la droga, los controles (n=12) se deprimen ~40% con una  $\tau \approx 3.9$  min, pero los SCMs SPARC (n=8) alcanzan  $\geq 60\%$  depresión con mayor rapidez ( $\tau \approx 2.8$  min). En ausencia de droga, todos los SCMs sufren un *rundown* que alcanza una depresión de ~15% con una  $\tau \approx 5.9$  min (línea punteada azul). Las barras representan el error estándar.

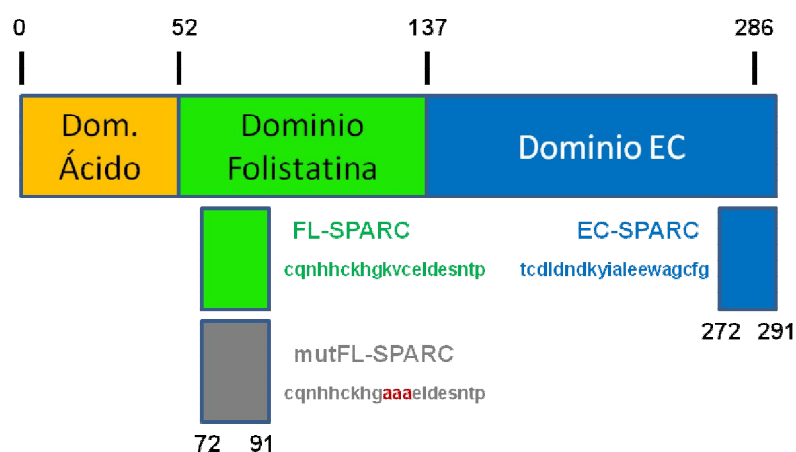
Los resultados de SPARC a bajas concentraciones (2.5 y 5 nM) demuestran que la exposición a la proteína favorece la depresión sináptica, a través de mecanismos que modifican el citoesqueleto presináptico de actina, haciéndolo más sensible al efecto de un agente despolimerizante. Estas características son propias de sinapsis inmaduras (Zhang & Benson, 2002; Morales et al., 2000).

Pero para seguir investigando sobre el mecanismo de acción de SPARC, observamos su estructura. Numerosos estudios han demostrado que SPARC es una

proteína que presenta una estructura primaria modular, y que algunas proteinasas identifican secuencias y la cortan generando péptidos bioactivos que podrían desarrollar nuevas funciones de la proteína (Sasaki et al., 1997; Murphy-Ullrich & Sage, 2014). Mediante el uso de algunos de estos péptidos investigamos cuál era el dominio funcional de la proteína SPARC sobre la neurotransmisión.

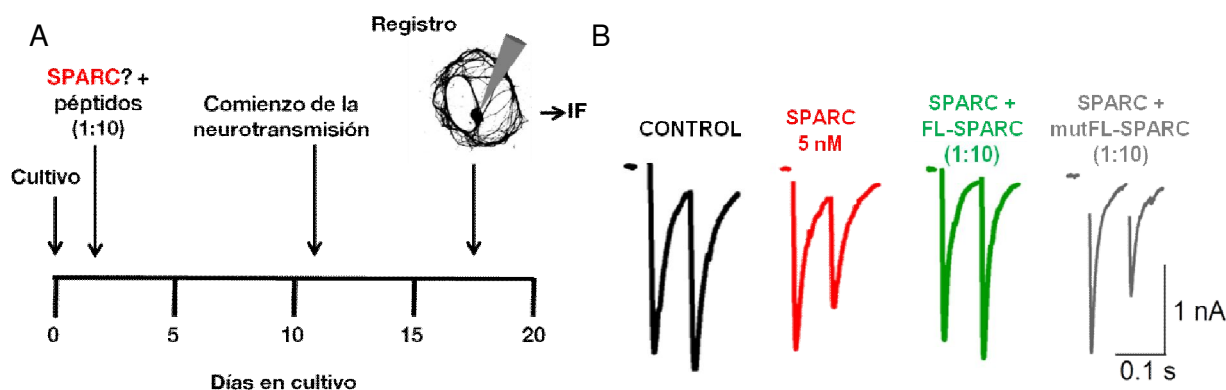
### 3.3. IDENTIFICACIÓN DEL DOMINIO FUNCIONAL DE SPARC. EFECTOS SOBRE EL FENOTIPO DE INMADUREZ.

Los péptidos utilizados fueron: el péptido 2.1 (le llamaré FL-SPARC, ya que es parte de la secuencia del dominio folistatina), el péptido 4.2 (le llamaré EC-SPARC, ya que es parte de la secuencia del dominio EC), y el péptido 2.1 mutado en la secuencia KVC, la cual se ha encontrado altamente conservada entre otras proteínas matricelulares que también contienen este dominio folistatina (le llamaré mutFL-SPARC, Fig. R43, ver introducción para más detalles).



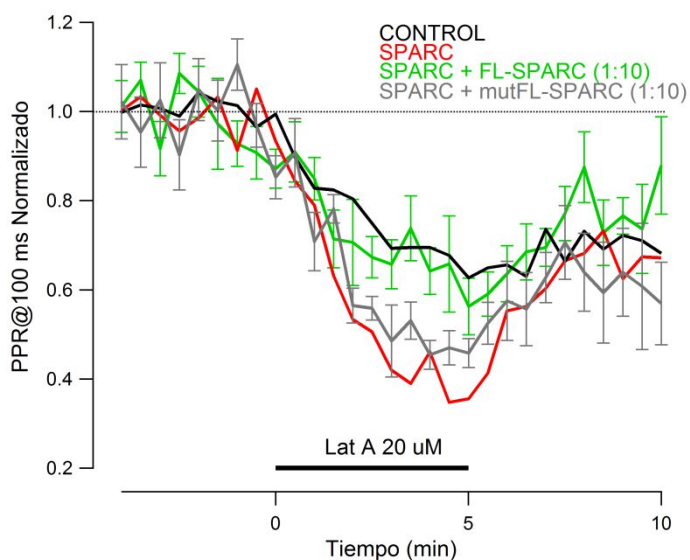
**Figura R43. Péptidos bioactivos de la proteína SPARC.** Se utilizan los péptidos FL-SPARC (dominio folistatina), mutFL-SPARC (dominio folistatina mutado) y EC-SPARC (dominio EC)

El uso de los péptidos bioactivos se realizó de acuerdo con la siguiente hipótesis experimental. Si el péptido estaba actuando, ejercería una acción aditiva a a la proteína entera. Si en cambio era inactivo o ejercía una acción competitiva, la acción de la proteína sería igual o menor. De este modo se aplicó cada uno de los péptidos de forma crónica en el cultivo junto a SPARC, pero diez veces más concentrados que la proteína. Los SCMs a 16-20 D.I.V. tratados de forma conjunta con SPARC (5 nM) y sendos péptidos FL-SPARC ó mut-FL-SPARC (1:10), presentaron un EPSC similar a los controles (Fig. R44 y 46). Sin embargo se observaron grandes diferencias en la plasticidad a corto plazo cuando se aplicó el protocolo de pulsos pareados (Fig. R44B).



**Figura R44. FL-SPARC inhibe el efecto de SPARC sobre la depresión sináptica.** A) Los péptidos a 50 nM, se añaden al cultivo junto con SPARC 5 nM en el primer cambio de medio. Los SCMs se registran  $\geq 16$  D.I.V. y se hace el estudio correlativo por inmunofluorescencia. B) Ejemplos de EPSCs evocados por pulsos pareados con 100 ms de intervalo. Obsérvese como SPARC a 5 nM favorece la depresión a corto plazo, y FL-SPARC inhibe el fenotipo cuando compete con la proteína. Sin embargo, una mutación del triplete KVC de FL-SPARC permite a la proteína ejercer su efecto sobre la plasticidad.

Además de los cambios observados en la PPR, los efectos de FL-SPARC también fueron evidentes durante la aplicación aguda de Lat-A (Fig. R45). Los SCMs tratados con SPARC + FL-SPARC se comportaron con un fenotipo control, mientras aquellos de la condición SPARC + mutFL-SPARC presentaron una marcada depresión típica del fenotipo SPARC (Fig. R45, compárese con Fig. R42B).

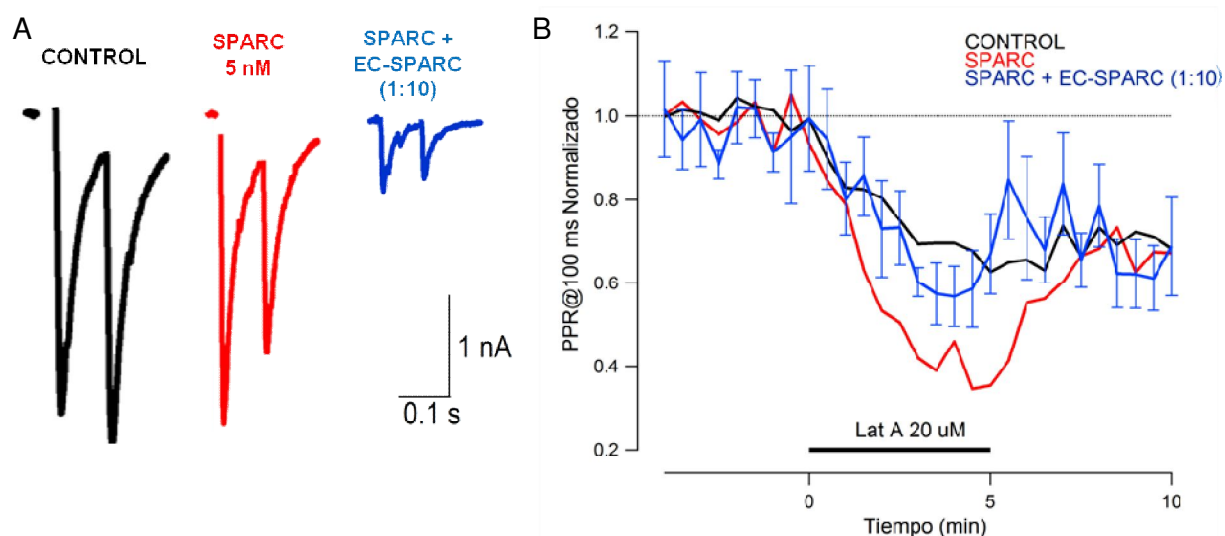


**Figura R45. FL-SPARC reduce la sensibilidad del citoesqueleto de actina a SPARC.** El efecto agudo de lat-A 20  $\mu$ M sobre la plasticidad a corto plazo de los SCMs tratados crónicamente con 5 nM SPARC y 50 nM FL-SPARC (n=18) ó 5 nM SPARC y 50 nM mutFL-SPARC (n=14).

Estos resultados sugerían que el dominio folistatina y concretamente el triplete de aminoácidos KVC eran importantes para el efecto observado de SPARC sobre la plasticidad y el citoesqueleto de actina a bajas concentraciones. Para comprobar si este fenómeno era una consecuencia accidental del uso de secuencias peptídicas, se trataron a los SCMs de forma crónica con los péptidos sólo en ausencia de

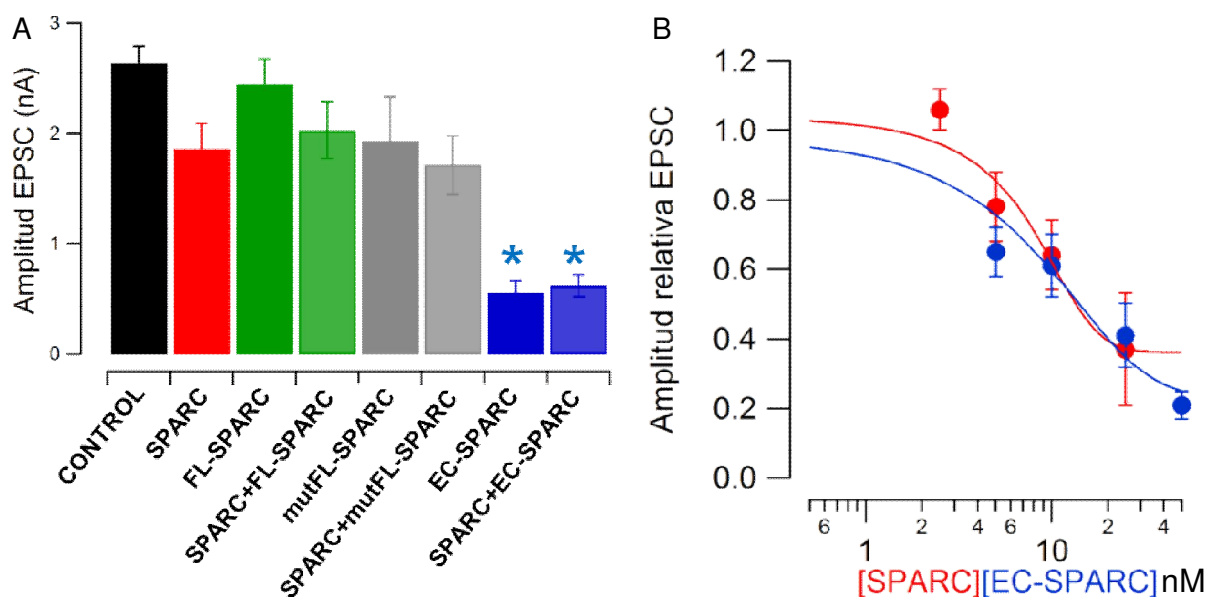
SPARC. En este caso, tanto la respuesta evocada como la plasticidad fueron similares a las neuronas control, indicando que estos péptidos no ejercían una actividad por sí solos.

En los SCMs tratados con SPARC + EC-SPARC (1:10) se observó un fenotipo completamente diferente. Aunque no se evidenció una diferencia clara en la plasticidad pues presentaban una gran variabilidad (Fig. R46B), el hecho más significativo fue la reducción del EPSC en un  $\sim 75\%$  ( $0.62 \pm 0.09$  nA) respecto del SCM control ( $2.64 \pm 0.15$  nA, Fig. R46A-R47).



**Figura R46. El péptido EC-SPARC reduce el EPSC en presencia de SPARC.** A) Ejemplos de EPSCs evocados por pulsos pareados con un intervalo de 100 ms. Obsérvese como las neuronas tratadas de forma crónica con 5 nM SPARC + 50 nM EC-SPARC reducen intensamente las corrientes evocadas. B) El efecto agudo de lat-A 20  $\mu$ M sobre la plasticidad a corto plazo de los SCMs tratados crónicamente con SPARC y el péptidos EC-SPARC ( $n=20$ ). Obsérvese la elevada variabilidad en PPR con este tratamiento.

Además, la reducción del EPSC ocurrió también en los SCMs tratados de forma crónica con 50 nM EC-SPARC sólo ( $0.56 \pm 0.10$  nA), indicando un efecto bioactivo de éste péptido (Fig. R47). Este efecto recordaba la acción de la proteína SPARC por encima de 20 nM. La curva dosis-respuesta de los SCMs tratados a diferentes concentraciones de EC-SPARC mostró cómo el péptido afectaba a la neurotransmisión exactamente igual que la proteína intacta, ya que sendas curvas dosis-respuesta coincidían (Fig. R47B).

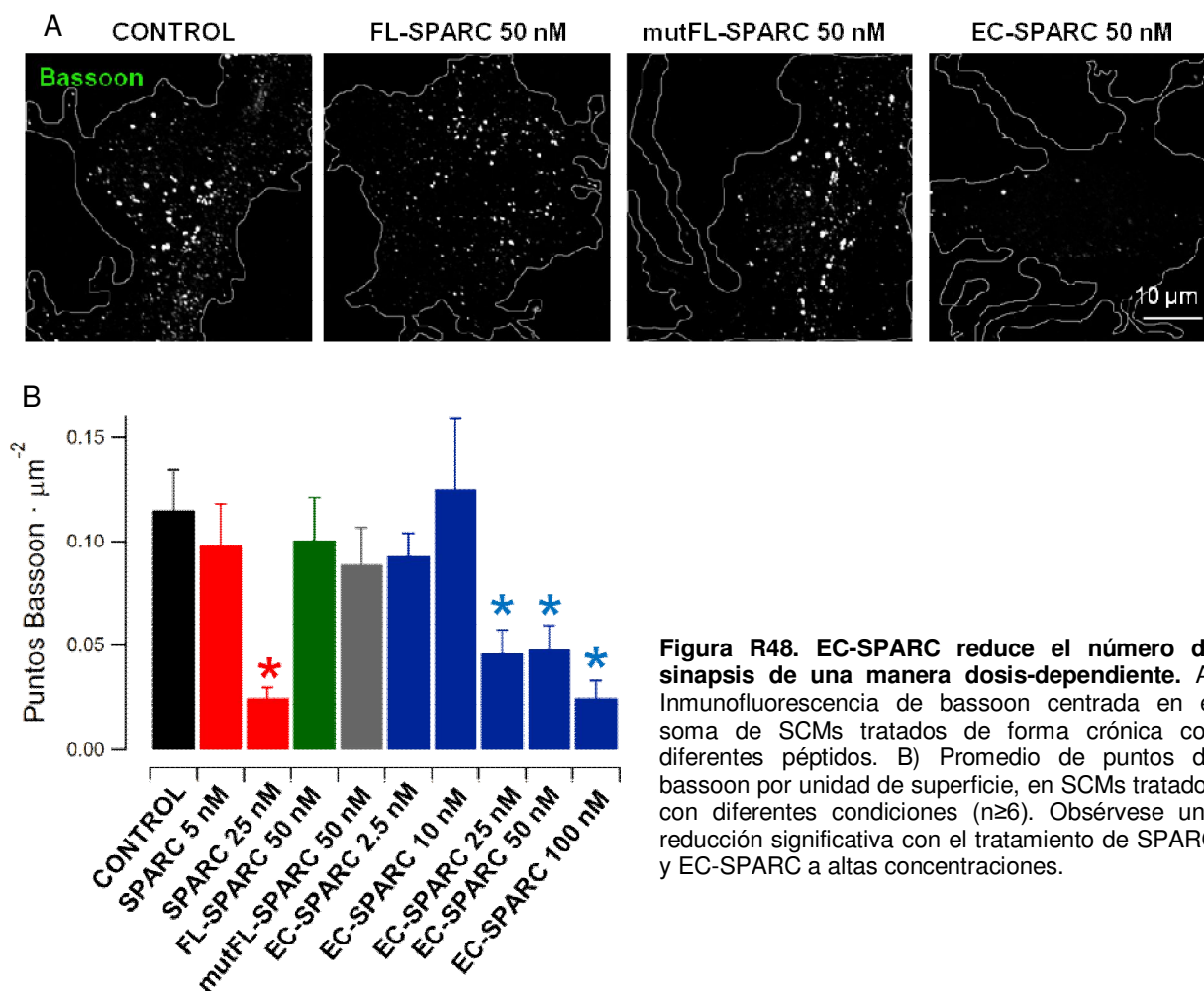


**.Figura R47. El péptido EC-SPARC es bioactivo y reduce la neurotransmisión de forma dosis-dependiente.** A) Amplitud promedio del EPSC de SCMs control (n=40) y tratados de forma crónica con SPARC 5 nM (n=16), FL-SPARC (n=6), SPARC+FL-SPARC (n=18), mutFL-SPARC (n=5), SPARC+mutFL-SPARC (n=14), EC-SPARC (n=22) y SPARC+EC-SPARC (n=20). Obsérvese la reducción significativa del EPSC con el péptido EC-SPARC a 50 nM, sólo en presencia de SPARC (asterisco,  $p < 0.01$ ). B) Curva dosis-respuesta de la amplitud del EPSCs en función de la concentración de EC-SPARC. Se compara con la Fig. R32. Ambas relaciones se ajustan a funciones sigmoidales prácticamente idénticas.

Las acciones similares del péptido EC-SPARC y SPARC sugirieron que el dominio EC era el responsable de la acción SPARC sobre la neurotransmisión. Por el contrario, como el péptido FL-SPARC no generó ningún fenotipo por sí sólo, excepto cuando competía con la proteína, se consideró que el dominio folistatina podría tener un papel modulador, pero no efector. Desde el punto de vista de actividad, EC-SPARC era equiparable a SPARC mientras que FL-SPARC podía ser considerado como un péptido inerte (o control).

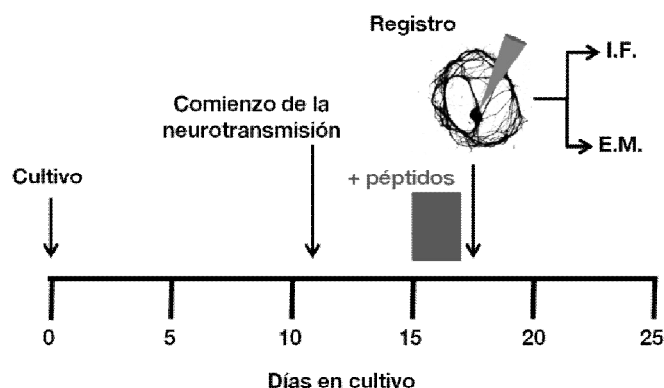
### 3.4. EFECTO DE SPARC COMO INDUCTOR DE LA ELIMINACIÓN SINÁPTICA.

El estudio correlativo de la respuesta sináptica con la inmunofluorescencia, determinó que el tratamiento crónico de EC-SPARC reducía el número de contactos sinápticos de forma dosis-dependiente, igual que hacía SPARC (figura R48).



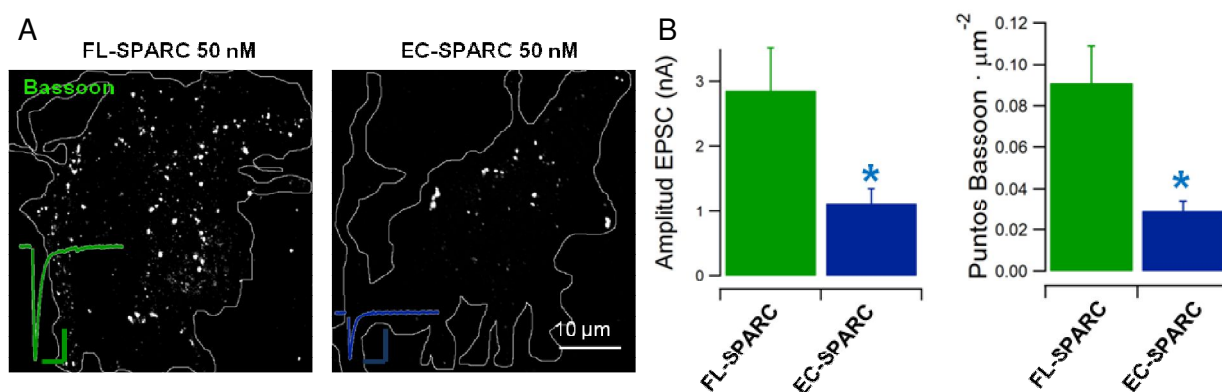
La reducción de la amplitud del EPSC y del número de contactos sinápticos con el péptido EC-SPARC indicaban que EC era el dominio funcional en la acción anti-sinaptogénica de la proteína.

A continuación, nos preguntamos si SPARC era capaz de eliminar sinapsis ya formadas y maduras. En anteriores trabajos en el laboratorio se había demostrado que SCMs tratados de forma crónica con 5 nM SPARC, cuyos terminales estaban retenidos en un fenotipo inmaduro, lograban madurar tan sólo 48 h después de suprimir la proteína del medio de cultivo (Albrecht *et al.*, 2012). Por lo tanto, nos planteamos añadir sendos péptidos FL- y EC-SPARC a 50 nM al medio de cultivo de neuronas desarrolladas normalmente (a partir de 15 D.I.V.) y estudiar el efecto sobre la neurotransmisión 48 h después (Fig.R49).



**Figura R49. Tratamiento agudo de los péptidos sobre sinapsis maduras.** Los péptidos FL- y EC-SPARC 50 nM se añaden en el medio de cultivo de SCMs control  $\geq 15$  D.I.V. y se registran 48h después. A continuación se realiza el estudio correlativo por inmunofluorescencia ó microscopía electrónica.

Los SCMs tratados con 50 nM del péptido FL-SPARC presentaron corrientes evocadas control ( $2.9 \pm 0.7$  nA), reforzando la idea que esta secuencia peptídica no ejercía una función directa sobre las sinapsis. En cambio, las neuronas tratadas con EC-SPARC sufrieron una reducción del  $\sim 60\%$  en la amplitud del EPSC ( $1.1 \pm 0.2$  nA). El estudio correlativo con inmunofluorescencia permitió demostrar que EC-SPARC era capaz de reducir de forma significativa la densidad de sinapsis maduras de  $0.09 \pm 0.02 \mu\text{m}^{-2}$  con FL-SPARC, a  $0.03 \pm 0.01 \mu\text{m}^{-2}$  (Fig. R50).



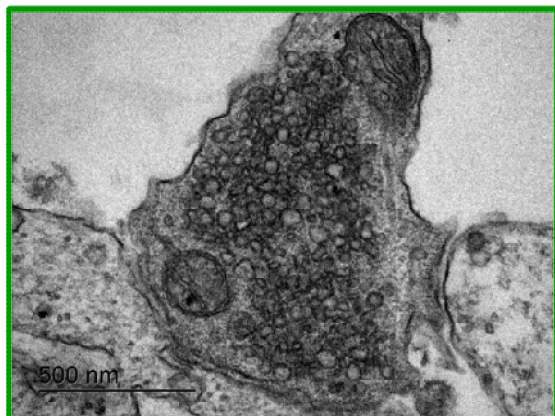
**Figura R50. EC-SPARC elimina sinapsis maduras de forma aguda.** A) Ejemplos representativos de inmunofluorescencia correlativa al EPSC que muestra una menor densidad de puntos de bassoon con el tratamiento durante 48 h con 50 nM EC-SPARC. Barra calibración 0.5 nA y 0.1 s. B) Amplitud del EPSC y densidad de puntos de bassoon promedio en ambas condiciones (n=11 y 6 SCMs de EC- y FL-SPARC respectivamente). Las barras representan el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

Pero para profundizar en el papel de SPARC en la eliminación sináptica, resultaba imprescindible conocer los cambios morfológicos y estructurales que se estaban produciendo en las sinapsis. Por ello, se realizó el estudio correlativo de funcionalidad y morfología mediante microscopía electrónica (Fig. R51-53).

Las imágenes de la ultraestructura de las neuronas tratadas de forma aguda con 50 nM de FL-SPARC, mostraron que los terminales presinápticos tenían un aspecto comparable a las sinapsis control. Presentaron un tamaño  $\sim 0.8 \mu\text{m}^2$ , una

elevada densidad de vesículas sinápticas ( $88 \pm 7 \mu\text{m}^{-2}$ ), apenas se observaron formas endocíticas por unidad de superficie ( $0.89 \pm 0.18 \mu\text{m}^{-2}$ ), ni otras estructuras endosomales como cuerpos multivesiculares ( $0.06 \pm 0.03$  por terminal, Fig. R51).

#### FL-SPARC 50 nM

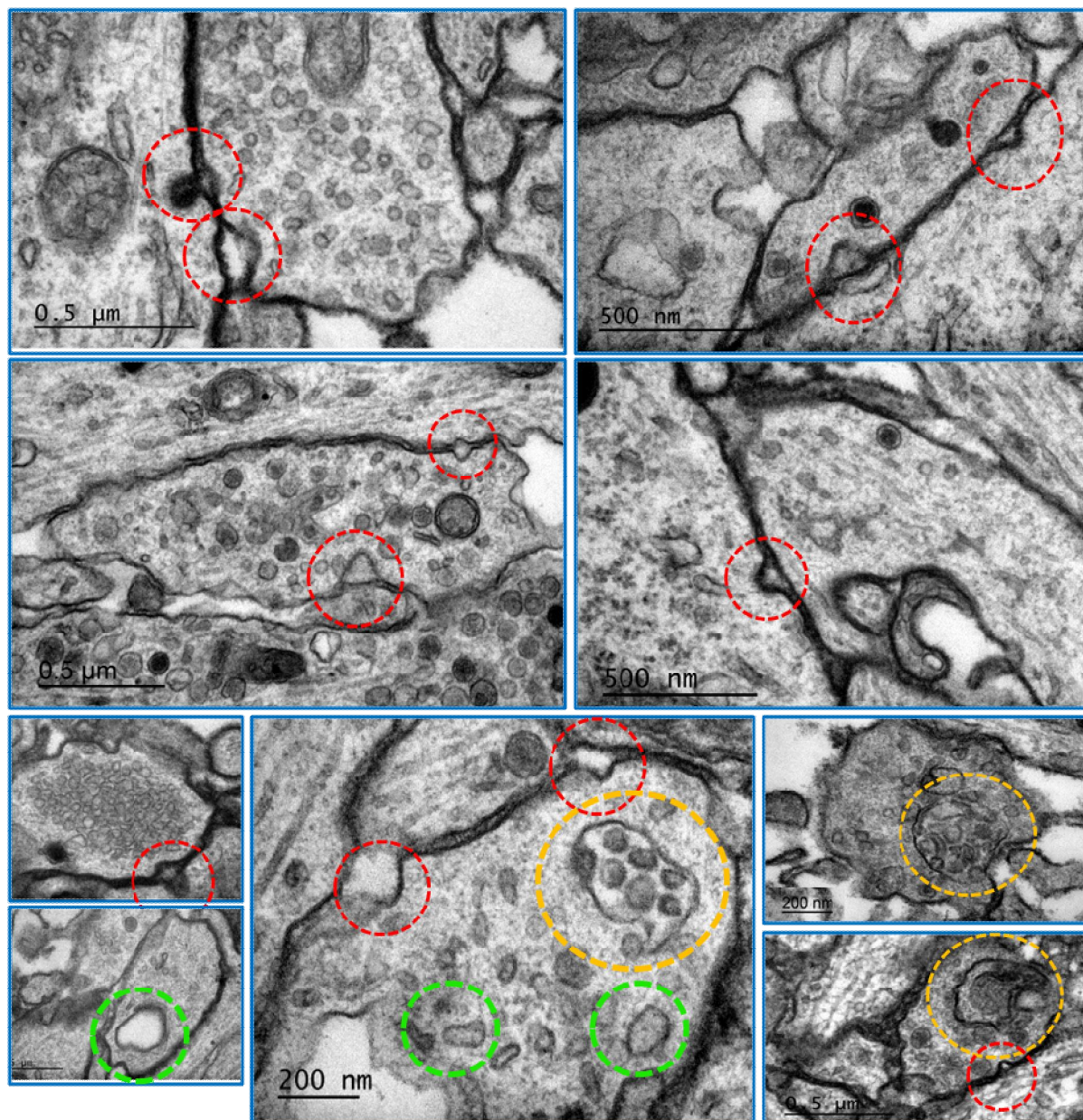


**Figura R51. El tratamiento agudo con FL-SPARC no afectó a las sinapsis maduras.** Ejemplo de un terminal presináptico de neurona >16 D.I.V., tratado con 50 nM de FL-SPARC durante 48 h. Presenta una alta densidad de vesículas y una apariencia control.

De forma contraria, los terminales tratados durante 48 h con 50 nM de EC-SPARC, presentaron ~2 veces menos de densidad de vesículas sinápticas en el citoplasma ( $48 \pm 9 \mu\text{m}^{-2}$ ) y en la zona activa. Además, se observaron ~4 veces más formas endocíticas tanto a nivel pre- como postsináptico. Ocasionalmente las invaginaciones pre- y postsinápticas coincidieron en el mismo punto, generando unas estructuras en forma "de copa". Estos resultados sugerían una posible separación de los terminales entre sí. También se observó un aumento significativo de estructuras endosomales, posiblemente relacionado con la elevada tasa endocítica, y una presencia ~14 veces mayor de cuerpos multivesiculares. Estos dos últimos fenómenos aparecían en ocasiones ocupando todo el terminal presináptico (Fig. R52)

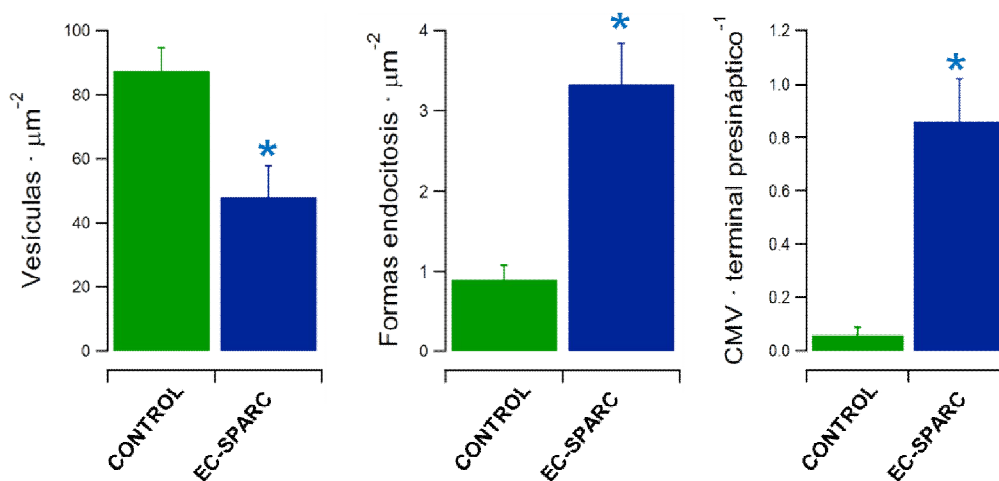


## EC-SPARC 50 nM



**Figura R52. EC-SPARC favorece la separación de las superficies pre- y postsináptica y aumenta la tasa endocítica.** Ejemplos de terminales presinápticos de neuronas  $\geq 16$  D.I.V. tratados con 50 nM EC-SPARC 48h. Se observan: menor densidad de vesículas sinápticas, numerosas estructuras endocíticas en la superficie que sugieren una tendencia a la separación de las membranas entre el terminal pre- y postsináptico (línea discontinua roja), elevada presencia de endosomas y cuerpos multivesiculares (línea discontinua verde y amarilla, respectivamente).

La Fig. R53 resume los fenómenos observados en las imágenes de microscopía electrónica de las dos condiciones, EC-SPARC ( $n=3$  SCMs con EPSCs entre 0.8 y 1.2 nA) y FL-SPARC ( $n=3$  SCMs con EPSCs entre 2.4 y 3.5 nA).



**Figura R53. EC-SPARC altera la morfología del terminal presináptico.** Con EC-SPARC se produce un cambio significativo en el número de vesículas, de formas endocíticas desde la superficie plasmática (tanto en el pre- como en el postsináptico) y de cuerpos multivesiculares, por unidad de superficie ( $p < 0.001$ )

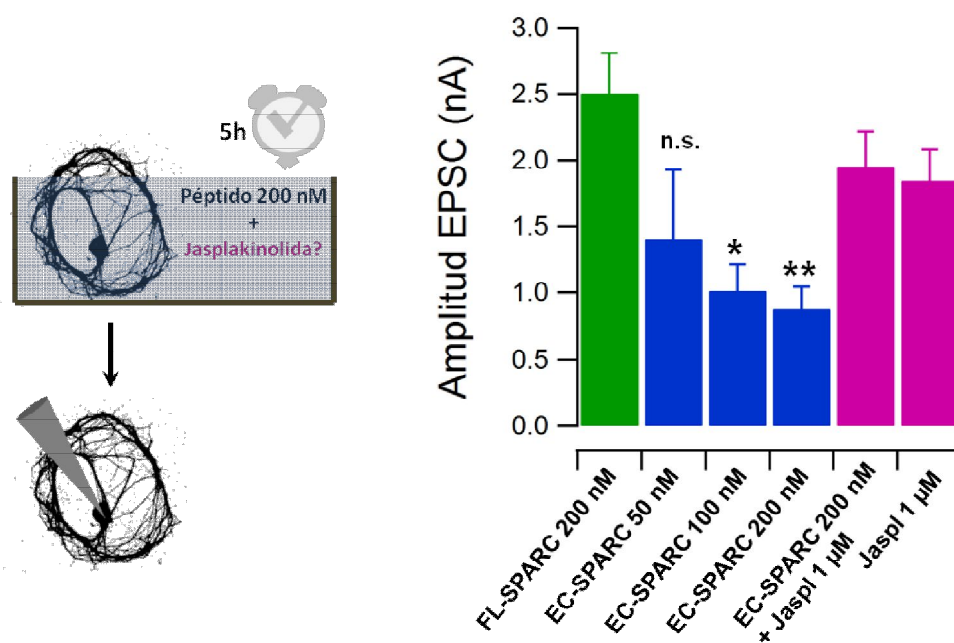
Todos estos resultados corroboraban que EC-SPARC en apenas 48 h estaba afectando a las sinapsis maduras. El efecto residía en una endocitosis masiva de la superficie en ambos terminales, acumulando endosomas y cuerpos multivesiculares que incluían vesículas sinápticas. El conjunto de estas evidencias morfológicas sugería una alteración de la integridad de las sinapsis.

Trabajos publicados en la unión neuromuscular de ratón demostraban que el proceso de la eliminación sináptica se produce en pocas horas. Éste se caracteriza por una separación de los terminales, formando estructuras bulbares que se retraen a causa de una endocitosis masiva. A su vez, dentro de los terminales se generaban cuerpos endosomales y multivesiculares debido a la elevada endocitosis. Además, existe una fuerte presencia de lisosomas en los terminales para degradar los cuerpos membranosos generados (ver introducción).

Podía ser que la escala de 48 h fuese poco representativa de un fenotipo de la eliminación sináptica. Por ello, se estudió la acción temporal del péptido EC-SPARC a diferentes concentraciones sobre los SCMs para determinar el efecto agudo más rápido. Se observó que a 200 nM y a partir de 5 h, las respuestas evocadas disminuían significativamente. Por el contrario, con el péptido FL-SPARC (control) no se obtuvieron diferencias.

Como ya se había descrito, SPARC afectaba al citoesqueleto de actina durante la maduración sináptica (Figs. R41-42), y probablemente el citoesqueleto podía estar participando en el proceso de eliminación. Para bloquear la despolimerización de actina se utilizó el fármaco jasplakinolida, que estabiliza los filamentos de la proteína

citoesquelética. La incubación del fármaco junto al péptido EC-SPARC inhibió la caída del EPSC, demostrando la evidente acción de SPARC sobre la actina (Fig. R54).

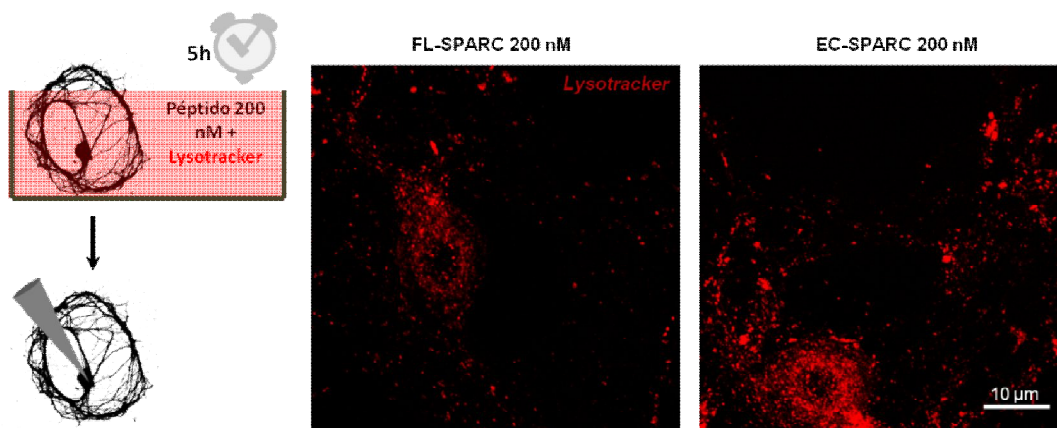


**Figura R54. EC-SPARC a alta concentración reduce de forma aguda la neurotransmisión alterando el citoesqueleto de actina.** EC-SPARC reduce la respuesta sináptica de forma aguda en una manera dosis-dependiente. Tras una incubación con 200 nM durante 5 h, se observa una caída significativa en la amplitud del EPSC respecto del FL-SPARC. El efecto de EC-SPARC se inhibe estabilizando el citoesqueleto de actina con jaspilkinolida a 1 μM, ( $n \geq 6$  para cada condición, \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ ).

Tal y como se había descrito para la eliminación durante el desarrollo de uniones neuromusculares (Bishop et al., 2004), se trató de averiguar si la actividad lisosomal también resultaba incrementada a las 5 h de tratamiento con sendos péptidos a una concentración 200 nM.

La densidad de lisosomas se investigó mediante dos métodos correlativos a la electrofisiología: inmunofluorescencia y microscopía electrónica.

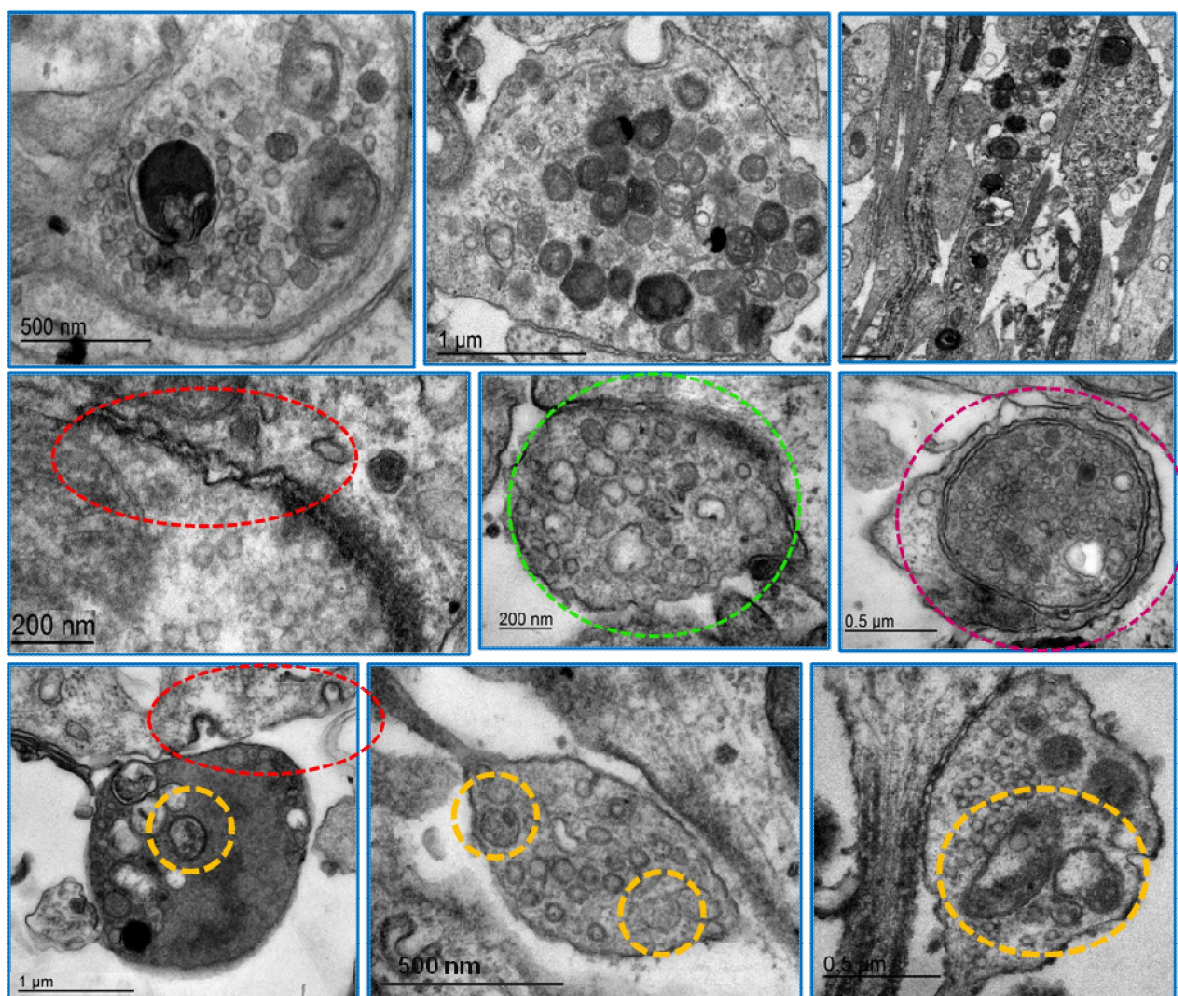
Para investigar los lisosomas por inmunofluorescencia se utilizó un trazador fluorescente de lisosomas (*lysotracker-red*) durante la incubación de sendos péptidos (Fig. R55). Los SCMs tratados con EC-SPARC presentaron en los procesos neuronales una densidad de puntos fluorescentes parecida a los controles ( $0.02 \pm 0.01$  y  $0.03 \pm 0.01 \mu\text{m}^{-2}$ , con FL- y EC-SPARC respectivamente). Sin embargo, los puntos tenían una mayor intensidad y un tamaño  $\sim 1.8$  veces superior (Fig. R55).



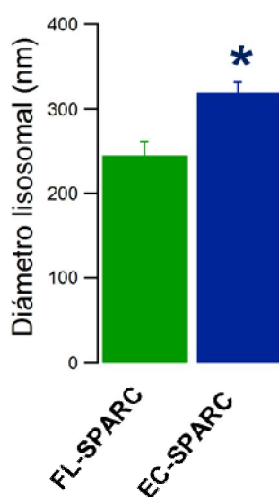
**Figura R55. EC-SPARC de forma aguda altera la actividad lisosomal.** Los SCMs se tratan con 200 nM de FL-ó EC-SPARC durante 5 h, en presencia de *lysotracker-red* 1  $\mu$ M en la última hora del tratamiento. Se observa una densidad similar de puntos discretos del trazador en ambas condiciones, pero con más intensidad de señal y el doble de tamaño en neuronas incubadas con EC-SPARC.

El análisis morfológico mediante microscopía electrónica, evidenció una presencia incrementada de lisosomas en los terminales presinápticos y en el axón de los SCMs tratados con EC-SPARC. Además, significativamente, los lisosomas eran  $\sim 1.3$  veces más grandes en el caso del péptido efector (Fig. R56B), como ya se observó por inmunofluorescencia. El incremento del tamaño lisosomal sugirió la presencia de lisosomas secundarios originados a partir de la fusión de lisosomas primarios a otras estructuras membranosas del terminal para degradarlos (Huotari & Helenius, 2011). También se identificaron estructuras similares a los bulbos de retracción descritos por Lichtman y colaboradores (Bishop et al., 2004). De nuevo, también se observó una elevada densidad de endosomas y cuerpos multivesiculares, tanto dentro como fuera de los terminales (exosomas). El conjunto de estos resultados era comparable a las observaciones de Lichtman y colaboradores durante la eliminación normal de NMJs (Fig. R56A).

A EC-SPARC 50 nM



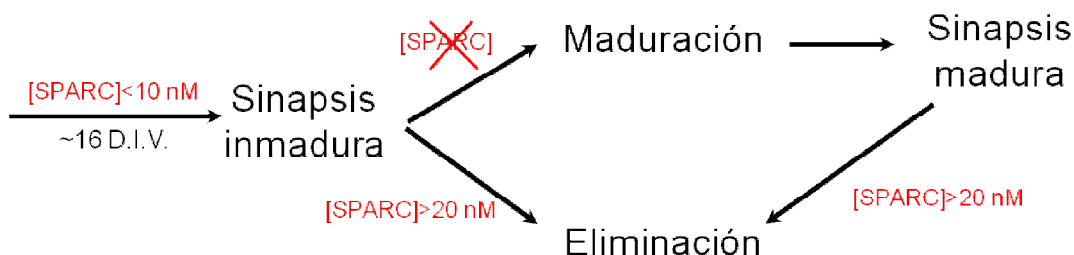
B



**Figura R56. EC-SPARC elimina sinapsis de forma aguda mediante la activación de un mecanismo autónomo neuronal.** A) Ultraestructura de un terminal tratado 5 h con EC-SPARC 200 nM. Obsérvese: elevada presencia de lisosomas, estructuras endocíticas (línea discontinua roja) tanto en el pre- como en el postsináptico, endosomas y cuerpos membranosos (línea discontinua verde), cuerpos multivesiculares (línea discontinua amarilla), terminales en forma de bulbo de retracción (imágenes inferiores), y estructuras con doble membrana que sugieren autofagosomas (línea discontinua morada). B) Diámetro promedio de los lisosomas cuantificados mediante microscopía electrónica en los procesos neuronales de SCMs tratados con sendos péptidos.

En conclusión, los resultados observados hasta aquí demuestran que SPARC, a alta concentración (>20 nM), desencadena una eliminación de la sinapsis (maduras e inmaduras) mediante la activación de un mecanismo autónomo

neuronal. El proceso comienza con el desensamblaje de las sinapsis por la retracción de los terminales presinápticos causado por una endocitosis masiva. A continuación se produce un aumento de la actividad lisosomal en los terminales presinápticos para la degradación de los cuerpos membranosos generados. Estos fenómenos son similares a los observados en la eliminación durante el desarrollo de la unión neuromuscular descrita por el Dr. Jeff Lichtmann (Song et al., 2008).



Para determinar la relevancia biológica de las observaciones *in vitro* pasamos a un modelo *in vivo*.

### 3.5. ESTUDIO DEL EFECTO FUNCIONAL DE SPARC SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN *IN VIVO*.

Para investigar la relevancia de SPARC *in vivo*, se pensó en estudiar el papel de la proteína en el ganglio cervical superior de rata, de donde se extraen las neuronas para los cultivos. Para realizar el seguimiento temporal se precisaba de un microscopio de excitación de dos fotones debido a la opacidad y a complejidad de los tejidos (Song et al., 2008), y no se disponía de él.

Descartada esta posibilidad se sugirió otro sistema colinérgico más accesible.

Por ello, se eligió el renacuajo del *Xenopus tropicalis*. Este modelo experimental permitía obtener una alta cantidad de animales con un mantenimiento sencillo, presentando una gran accesibilidad de los tejidos debido a la transparencia de las larvas. Además, permitía observar si la acción de SPARC era conservada entre vertebrados. Finalmente, una gran ventaja del uso de renacuajos de *Xenopus tropicalis* es que el movimiento de la cola está regida exclusivamente por NMJs.

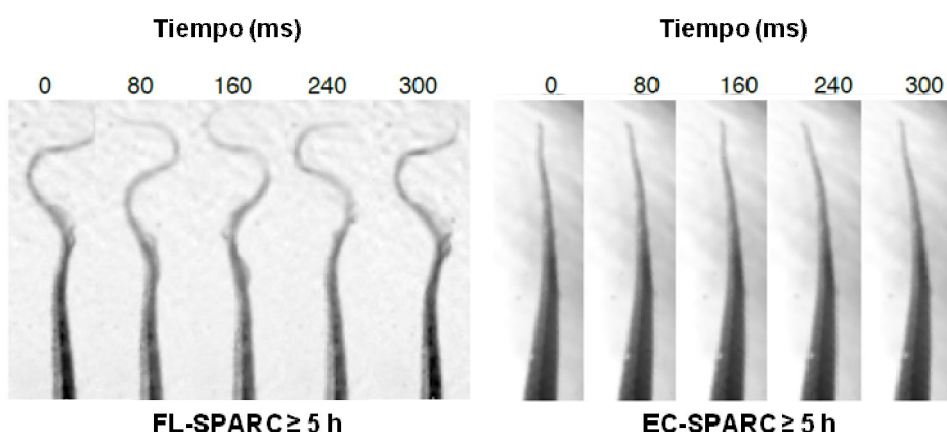
Los *Xenopus tropicalis*, desde el final de la etapa embrionaria (~estadío 42) hasta la metamorfosis para transformarse en rana (~estadío 65), pasan por diferentes estadios bien diferenciados. La etapa premetamórfica (estadios 42-57 aprox.) consiste en el desarrollo y crecimiento de los renacuajos, cuya principal estructura para nadar es la cola. En el período prometamórfico (estadío 58-62), los

animales comienzan la transformación metamórfica y desarrollan las patas delanteras y traseras que adquieren movilidad progresivamente. En esta etapa el movimiento es coordinado entre la cola y las patas. Cuando el animal llega al clímax metamórfico (~estadío 63-64), el renacuajo adquiere la apariencia de rana, pero aún contiene la cola. En este punto, ya no es funcional y comienza a ser eliminada (*tail resorption program*).

Para nuestros experimentos se consideró que la etapa premetamórfica era el estadio idóneo para estudiar el efecto de SPARC sobre las uniones neuromusculares de la cola, ya que su actividad viene controlada por un solo grupo de neuronas: el depósito de motoneuronas primario.

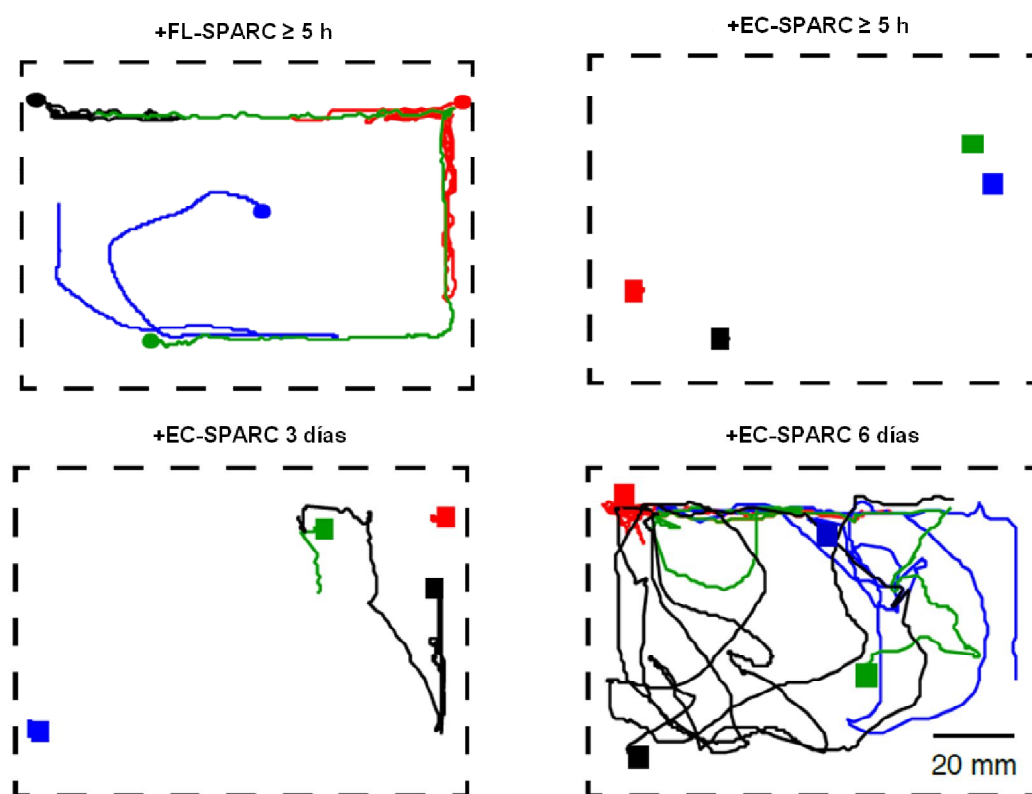
En grupos de renacuajos en estadio ~50-51, se inyectaron los péptidos, EC-SPARC y FL-SPARC, a una concentración de 500  $\mu\text{M}$  a nivel de las somitas. Un ensayo previo de la inyección con *lucifer yellow* determinó que a esta concentración, se producía una difusión completa del volumen inyectado por toda la cola (materiales y métodos).

Los animales tratados con FL-SPARC no presentaron ningún fenotipo y continuaron con un movimiento armónico en la cola a una frecuencia de ~3 Hz, que les permitió un comportamiento típico de animales control. Por el contrario, aquéllos inyectados con EC-SPARC sufrieron una paralización en el movimiento de la cola que quedó completamente rígida al cabo de 5 h (Fig. R57).



**Figura R57. La cola de los renacuajo de *X.tropicalis* quedan rígidas tras la inyección de EC-SPARC.** Movimiento de las colas de los renacuajo de *X.tropicalis* en un estadio 50-51, tras la inyección de 500  $\mu\text{M}$  de sendos péptidos. Después de 5 h, los animales inyectados con FL-SPARC presentan un movimiento armónico de la cola a ~3 Hz. El ~10% de los renacuajos tratados con EC-SPARC sufren una paralización de la cola que les imposibilita nadar. Este efecto se recupera a partir de los 3 días desde la inyección.

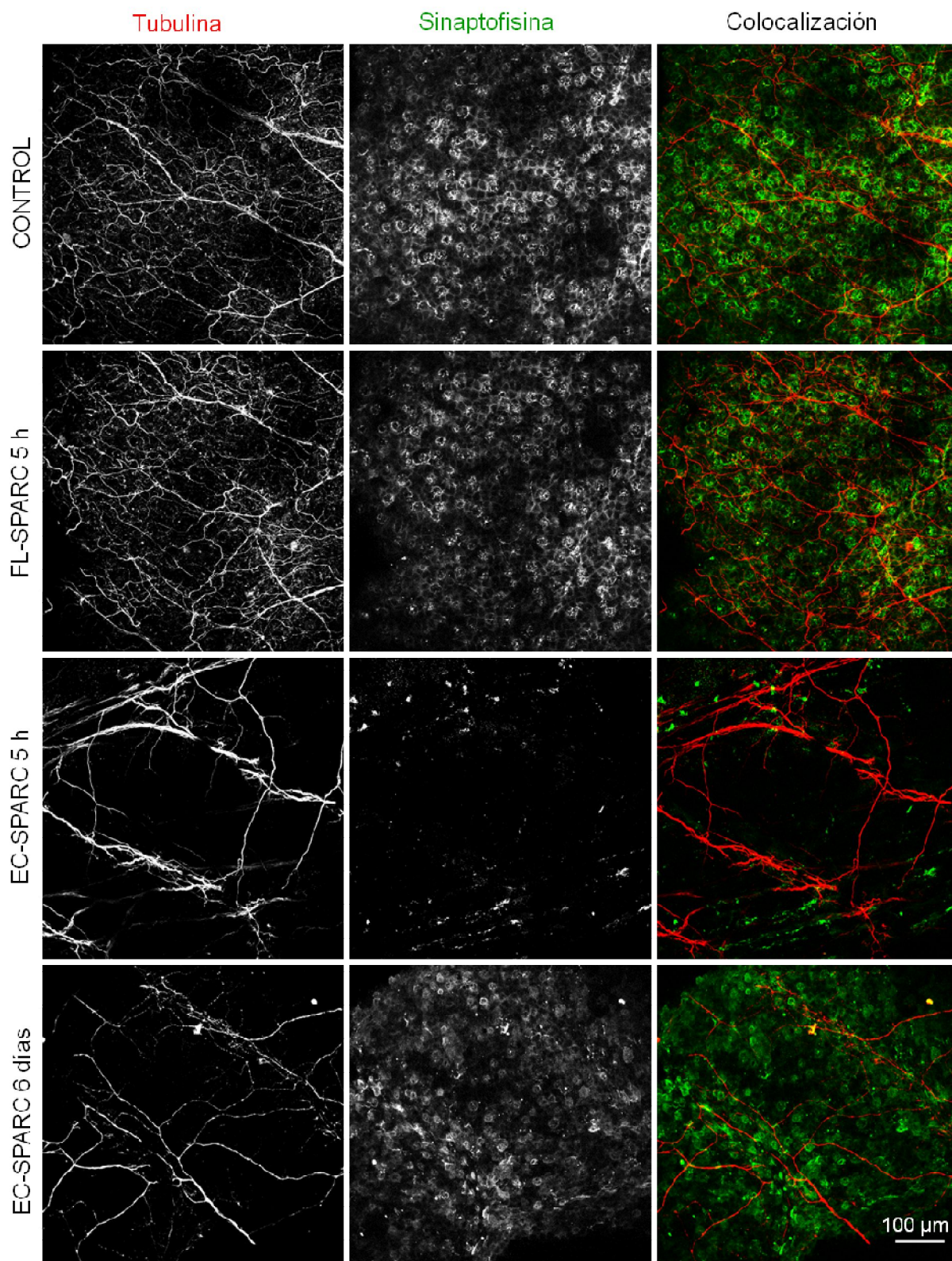
Con el péptido FL-SPARC se observó un comportamiento normal, en el que los renacuajos se desplazaron de forma aleatoria por el agua mediante movimientos oscilatorios de la cola. Pero la parálisis generada por EC-SPARC provocó que estos animales permanecieran quietos en la base de la pecera. Se les hizo un seguimiento temporal del movimiento hasta observar la casi total recuperación que ocurrió a los 6 días (Fig. R58). Durante este tiempo, no se observaron alteradas otras funciones biológicas, como la respiración o el latido cardíaco, y tampoco las capacidades sensoriales. El roce con otros animales o la fricción mecánica con una pipeta, provocaba movimientos en el animal. Si embargo, el período de actividad fue breve. Los renacuajos se "fatigaban" rápidamente, muy probablemente debido a un bajo número de NMJs funcionales tal y como demostró el análisis morfológico (Fig. R59).



**Figura R58.** El péptido EC-SPARC inhibe la movilidad de los renacuajos de *Xenopus tropicalis*. B) Esquema del seguimiento de 4 renacuajos (cada uno representa un color) tratados con sendos péptidos, 5 h, 3 y 6 días después de la inyección. Cada trazo representa el desplazamiento durante 30 s por una pecera de 12x9 cm. Obsérvese un comportamiento normal con FL-SPARC. Con EC-SPARC, la movilidad queda inhibida a las 5 h de la inyección, y se recupera progresivamente 6 días después.

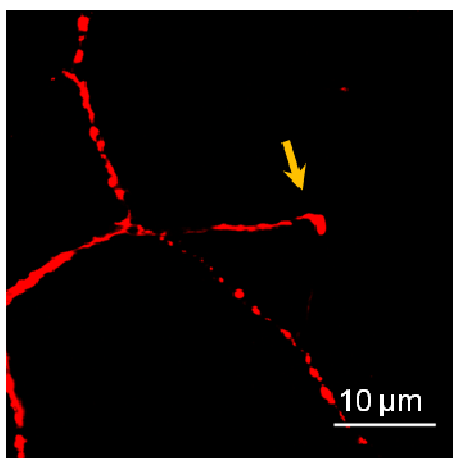
El estudio de las NMJs por inmunofluorescencia demostró el siguiente patrón (figura R59):





**Figura R59. EC-SPARC elimina las uniones neuromusculares de *Xenopus tropicalis*.** Inmunofluorescencia para sinaptofisina (verde) y tubulina acetilada (rojo) en la cola de renacuajos de *X.tropicalis* en diferentes condiciones. Todos los animales se encontraban en un estadio 50-51. Los animales inyectados con FL-SPARC presentan una distribución de uniones neuromusculares similar a los controles sin inyectar. Obsérvese la eliminación de las uniones neuromusculares y la retracción de los procesos axónicos finos a las 5 horas de la inyección con EC-SPARC. La recuperación se observó a los 6 días desde la inyección.

Para el estudio morfológico, se fijaron animales a los mismos tiempos a los que se observó un efecto en el comportamiento. Las colas se inmunomarcaron para una proteína presináptica (sinaptofisina) y una axónica (tubulina acetilada, Fig. R59). Las que habían sido inyectadas con FL-SPARC 5 h antes, presentaban un patrón de NMJs en roseta con terminales axónicos perfectamente definidos, y similares a los observados en animales control. Pero las colas inyectadas con EC-SPARC, a las 5 horas presentaron una eliminación masiva de las NMJs. El marcaje de sinaptofisina mostraba una completa desestructuración de las sinapsis y la tubulina acetilada evidenciaba la pérdida de los procesos axónicos más finos (Fig. R59). Además se observó un patrón de retracción axónica con estructuras en forma de bulbos (Fig. R60), similares a las descritas en la unión neuromuscular de rata (Bishop et al., 2004). Estos resultados explicaban el fenotipo de rigidez observado. Además, la recuperación funcional a los 6 días también coincidió con una regeneración parcial de las NMJs. En este punto, los procesos axónicos más finos no aparecieron completamente recuperados, aunque la reinervación es evidente con el marcaje de sinaptofisina (Fig. R59).

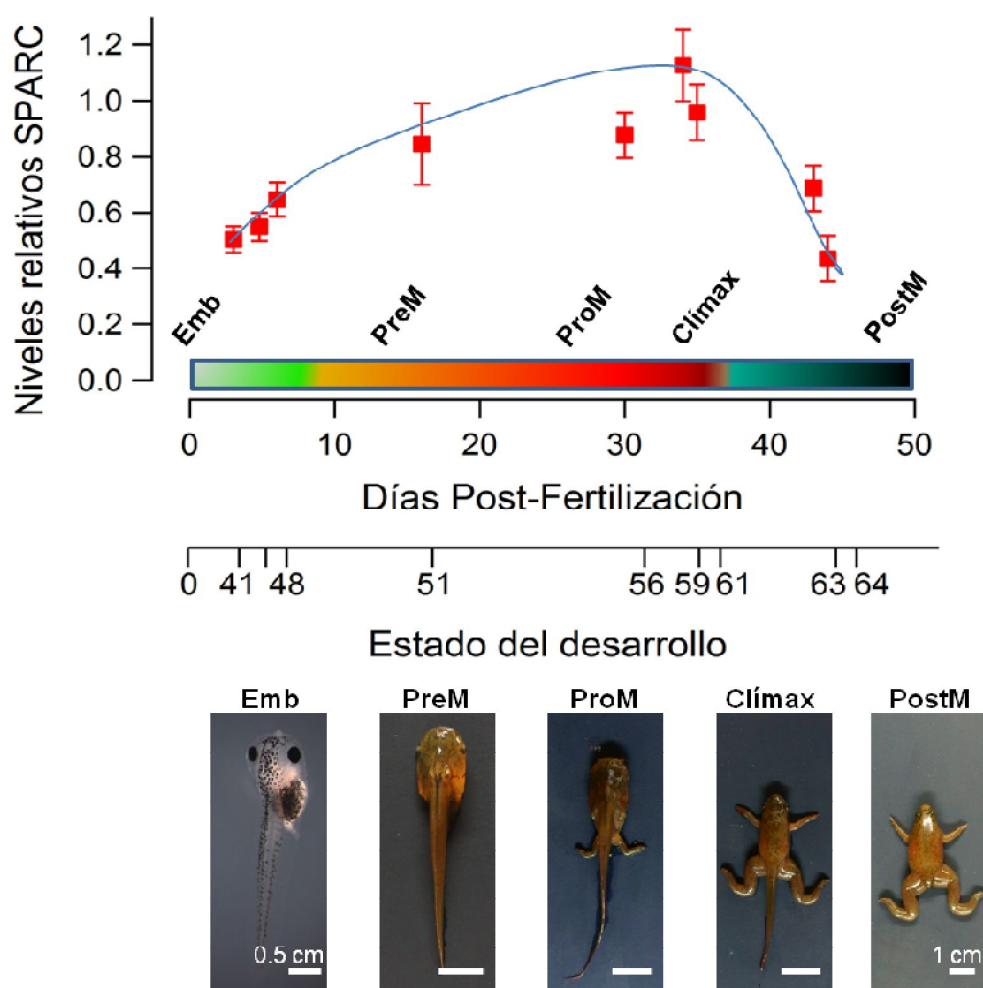


**Figura R60. Bulbos axónicos de retracción generados por EC-SPARC durante la eliminación sináptica.** El inmunomarcaje de tubulina acetilada en la cola de un renacuajo 5 horas después de ser inyectados con EC-SPARC, muestra bulbos de retracción (flecha amarilla) y otros cuerpos derivados del axón.

Con estos resultados se demuestra que SPARC a altas concentraciones, no sólo favorece el desensamblaje de los terminales entre sí, como se observó en las neuronas autápticas *in vitro*, sino que es capaz de causar la eliminación sináptica.

Al igual que se mostró en el SCG de rata durante el desarrollo (Fig. R35), nos preguntamos cómo eran los niveles de expresión de SPARC en la cola del *Xenopus tropicalis* (Fig. R61), para así conocer mejor el significado biológico de la proteína en este animal.

En el momento clímax de la metamorfosis, se produce la reabsorción de la cola, en la que todos los tejidos y tipos celulares (músculo, fibroblastos, piel, médula espinal y nervios, etc) se pierden al mismo tiempo (Elinson, Remo, & Brown, 1999). Así, nos preguntamos si SPARC estaba relacionada con este fenómeno y si podía tener un rol en este proceso de eliminación de la cola. Para ello, en colaboración con la Dra. Beatrice Terni, se tomaron colas de renacuajos a diferentes estadios del desarrollo, desde el final del período embrionario hasta la completa metamorfosis (Fig. R61).



**Figura R61. El pico de expresión de SPARC en la cola de los renacuajos de *Xenopus tropicalis* coincide con su momento de eliminación.** Los niveles de expresión de SPARC en la cola del *Xenopus tropicalis* son máximos en el clímax de la metamorfosis, donde se produce la reabsorción de todos los tejidos de la cola y la eliminación de ésta.

El *western-blot* determinó un máximo de expresión de SPARC alrededor del estadio 59 - 60, cuando comienza la reabsorción de la cola para ser totalmente

eliminada, hasta caer a niveles más bajos que aquéllos observados al final de la embriogénesis (Fig. R61).

Estos resultados sugieren, nuevamente, la necesidad de niveles elevados de SPARC durante el refinamiento de sinapsis colinérgicas, como la NMJ.

En resumen, este capítulo de la tesis demuestra que SPARC, una proteína liberada exclusivamente por la glía en el sistema nervioso, participa en plasticidad presináptica. El papel es dual en función de la concentración, variando entre inmadurez y eliminación sináptica.



# DISCUSIÓN

*"No debemos buscar, sino encontrar, no debemos juzgar, sino observar y comprender, inspirar y elaborar lo inspirado. Tenemos que sentir nuestra propia esencia integrada y ordenada en el todo. Sólo entonces tendremos relaciones verdaderas con la naturaleza"*

Hermann Hesse



La endocitosis es un mecanismo importante tanto para mantener la funcionalidad de los terminales presinápticos como para eliminarlos, por tres motivos: *i*) durante la maduración, la formación de los depósitos de vesículas y otras estructuras membranosas dependen del reciclaje desde la superficie plasmática (Saheki & De Camilli, 2012); *ii*) en terminales maduros, el ciclo óptimo de las vesículas permite el mantenimiento del balance exo-endocitosis y evita la depresión sináptica (Balaji, Armbruster, & Ryan, 2008); y *iii*) en el refinado sináptico, la endocitosis masiva y la maduración de los endosomas son el punto de partida para la degradación de las membranas y la eliminación de la sinapsis. En esta tesis doctoral se han estudiado cómo las características funcionales del terminal presináptico en diferentes etapas del desarrollo afectan a la plasticidad sináptica.

Los resultados han sido demostrados principalmente en un modelo *in vitro* de sinapsis autápticas colinérgicas a partir de neuronas del ganglio cervical superior de rata. Este modelo de sinapsis presenta dos ventajas principales: permite el estudio de la actividad sináptica en una misma célula que es a su vez pre- y postsináptica, y posibilita el establecimiento de sinapsis funcionales en ausencia de células gliales. Esta última característica ha permitido controlar y modificar a voluntad la concentración de cualquier factor secretado por la glía al medio de cultivo para estudiar su efecto sobre la neurotransmisión.

En primer lugar se ha caracterizado funcionalmente la plasticidad sináptica de los SCMs durante la maduración *in vitro*. Los primeros resultados demuestran que el comienzo de la neurotransmisión ocurre alrededor de los ~13 D.I.V. En nuestra preparación experimental, se ha considerado que el número de contactos sinápticos que inician la neurotransmisión es similar al número de sinapsis que se desarrollan y maduran (Fig. R39, Albrecht et al., 2012). Esta observación es comparable a la de estudios previos mediante el análisis de la ultraestructura (Furshpan et al., 1986). En cambio, *in vivo*, donde la glía rodea a las sinapsis, las mismas neuronas sufren un proceso de refinado en el que el número de sinapsis formadas es superior al número final que maduran (Heath, et al., 1992).

Por lo tanto, los cambios funcionales observados desde los ~13 hasta los 20 D.I.V., corresponden a la maduración de las mismas sinapsis, sin que tenga lugar el proceso de eliminación. Es decir, el modelo *in vitro* no dispone de aquellos factores y/o elementos que en condiciones *in vivo* dan lugar a la eliminación.

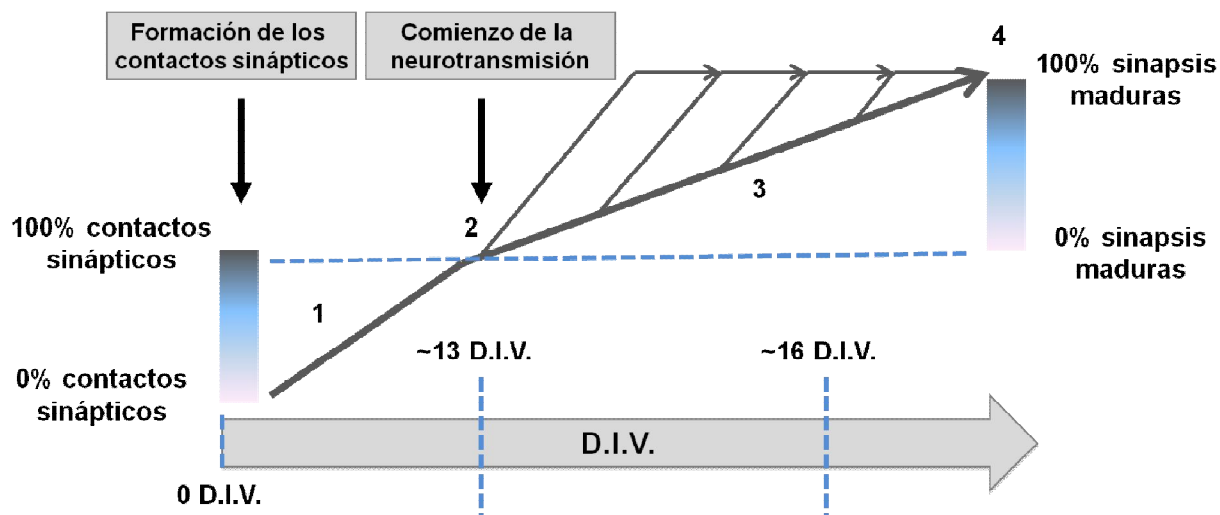


Durante la maduración *in vitro* de los SCMs se observan los siguientes cambios funcionales: *i*) aumento de sinapsis operativas (Fig. R1); *ii*) incremento de la amplitud de las respuesta postsinápticas (Fig. R3); *iii*) disminución de la depresión a corto plazo (Fig. R3-R4); *iv*) aumento del tamaño del RRP (Fig. R5); y *v*) reducción de la frecuencia de actividad espontánea (Albrecht et al., 2012). El conjunto de los resultados en este modelo colinérgico, es similar al observado en sinapsis del sistema nervioso central durante el desarrollo (Feldmeyer & Radnikow, 2009; Andrae, et al., 2012).

Las variaciones funcionales van asociadas a cambios morfológicos. En neuronas del SCG *in vitro* se ha observado un crecimiento del tamaño de los terminales presinápticos y un relleno progresivo de las vesículas sinápticas (Furshpan et al., 1986; Rees, et al., 1976). Estas evidencias explicarían el aumento de la capacitancia (Fig. R2) y también del EPSC y RRP, que se incrementan ~5 y ~7 veces desde los 13 a los 20 D.I.V., respectivamente (Figs. R3 y R5). En términos cuantales, esto implica que el total de las sinapsis estimuladas pasan de ~8 a >100 vesículas liberadas frente a un tren de estímulos a 14 Hz que agota el RRP (Fig. R5). Estos resultados son equiparables a los observados en sinapsis "estándar", como las hipocampales, donde se produce un relleno progresivo de los depósitos citoplasmáticos y de liberación (Mozhayeva, et al., 2002).

El incremento de la densidad de vesículas junto a los cambios en la plasticidad a corto plazo, muestran la relevancia de la maduración a nivel presináptico (Zucker & Regehr, 2002). Como demuestra el protocolo de pulsos pareados, la relación entre las corrientes evocadas en un intervalo de tiempo de 1 s aumenta de ~0.5 a ~1 desde los 13 a los 20 D.I.V. (Fig. R4). Este resultado sugiere que,  $\leq 15$  D.I.V las sinapsis operan a alta probabilidad de liberación favoreciendo la depresión sináptica, pero a partir de este momento se da una transición hacia una baja probabilidad de liberación.

En la Fig. D1 se muestra el resumen del proceso de maduración de los SCMs. Durante los primeros días tras el comienzo de la neurotransmisión (13-15 D.I.V.), existe mayor probabilidad de encontrar un fenotipo de inmadurez sináptica. Progresivamente, estos contactos sinápticos sufren cambios tanto morfológicos como funcionales durante el desarrollo. Y,  $\geq 16$  D.I.V. existe mayor probabilidad de encontrar la madurez sináptica en los SCMs *in vitro*.



**Figura D1. Modelo de la maduración funcional de las sinapsis colinérgicas *in vitro*.** Se distinguen cuatro etapas en los SCMs: 1) Formación de los contactos sinápticos. Esta etapa ocurre durante un período de ~2 semanas. 2) Comienzo de la neurotransmisión. Se produce un cambio de fenotipo de adrenérgico a colinérgico que permite la generación de EPSCs con características de inmadurez (ver texto). 3) Maduración. Las sinapsis inmaduras sufren cambios morfológicos y funcionales para alcanzar la madurez sináptica. Algunas sinapsis sufren estos cambios más rápidas que otras. 4) Fenotipo de madurez. Todas las sinapsis formadas alcanzan la madurez sináptica.

*In vivo*, el proceso de maduración sináptica puede verse alterado por la presencia de factores liberados por otros tipos celulares, principalmente la glía (Murphy-Ullrich & Sage, 2014; Chung et al., 2015). Una de las moléculas que se secreta en mayor cantidad es SPARC. Se trata de una proteína matricelular liberada de forma constitutiva durante el desarrollo (Ullian, et al., 2004; Vincent et al., 2008), que ejerce un efecto inhibitor en la sinaptogénesis. Es conocido su efecto antagonista de la acción sinaptogénica de otra proteína matricelular, hevin (Kucukdereli et al., 2011). A pesar de este efecto, hasta ahora se desconocía si actuaba directamente sobre la neurotransmisión.

Para conocer la concentración biológica de SPARC, previamente en el laboratorio se establecieron cultivos masivos de glía (células de Schwann) del SCG. Los medios de cultivo de estas células siempre presentaban concentraciones de la proteína ~1-5 nM. Adicionalmente, se desarrolló un modelo de difusión de la proteína para estimar las concentraciones fisiológicamente relevantes que estarían recibiendo las sinapsis, teniendo en cuenta que: *i*) SPARC se libera a partir de la exocitosis de vesículas que se encuentran en la glía (Albrecht et al., 2012), y *ii*) las células gliales rodean a las sinapsis (Eroglu & Barres, 2010), siendo la distancia entre las membranas de las neuronas y la glía de 20 a 40 nm (Ventura & Harris, 1999). Con estas consideraciones, los cálculos del modelo mostraron que el contenido proteico de una sola vesícula, podía cubrir ~30  $\mu\text{m}^2$  de superficie neuronal con una

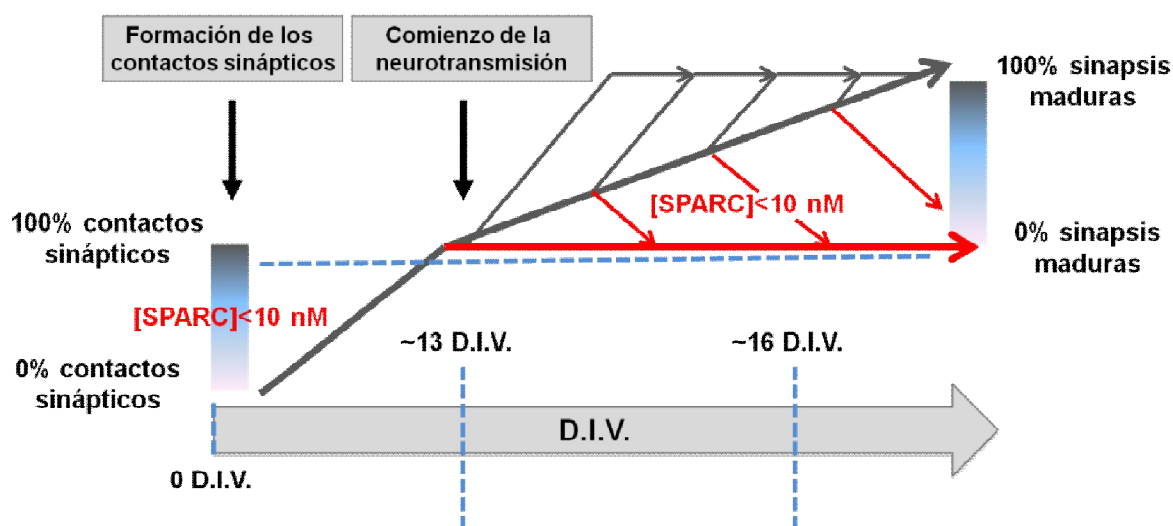
concentración  $>1$  nM (Albrecht et al., 2012). Por lo tanto la liberación de un número mayor de vesículas permitiría fácilmente que las sinapsis percibieran un espectro de concentraciones de SPARC  $>1$  nM.

Estos datos pueden sumarse a los obtenidos con el estudio de la expresión de SPARC durante el desarrollo de sinapsis colinérgicas en dos estructuras nerviosas diferentes: el SCG de rata (Fig. R35) y la cola del renacuajo de *Xenopus tropicalis* (Fig. R61). Los resultados demuestran que SPARC es una proteína muy conservada entre diferentes especies de vertebrados. Este hecho le otorga un papel biológico importante en el desarrollo. Además, los resultados evidencian que la glía está programada para liberar SPARC, alcanzándose un pico en momentos concretos del desarrollo. En ambos sistemas, la máxima expresión de SPARC coincide con el período de eliminación de las sinapsis colinérgicas (Heath et al., 1992; Brown & Cai, 2007). Una vez finalizado el desarrollo, los niveles de expresión de la proteína se ven reducidos a un nivel mínimo, hecho que sugiere una implicación directa de SPARC en el período de refinamiento.

Los experimentos en microcultivos establecidos en ausencia de glía, permiten estudiar el efecto SPARC sobre la neurotransmisión, controlando la concentración de la proteína. De la curva dosis-respuesta (Fig. R32), se puede determinar el comportamiento de la proteína sobre la neurotransmisión en función de la concentración. SPARC genera una pérdida de los contactos sinápticos de una manera dosis-dependiente (Figs. R33-R34), con una concentración media efectiva de  $\sim 13$  nM. A bajas concentraciones (2.5-5 nM), el número de sinapsis se mantiene pero quedan arrestadas en un fenotipo de inmadurez. En cambio, a concentración elevada ( $>20$  nM), SPARC desencadena un programa autónomo en la neurona para eliminar sinapsis.

Los terminales presinápticos tratados de forma crónica con 2.5-5 nM de SPARC presentan características que los diferencian de los encontrados en las neuronas control en la misma etapa del desarrollo (Albrecht et al., 2012):  $\sim 3$  veces menos en la densidad de vesículas totales en el terminal presináptico (Fig. R36-R37), una reducción del  $\sim 45\%$  en el RRP (Fig. R38-R39), un incremento de la depresión a corto plazo (Fig. R36) y de la probabilidad de liberación; y  $\sim 13$  veces más en la frecuencia de mEPSCs. Todas estas características son propias de las sinapsis inmaduras (Mozhayeva et al., 2002; Feldmeyer & Radnikow, 2009; Andreae et al., 2012).

La reducción de los depósitos de vesículas sugiere un efecto de SPARC sobre los mecanismos endocíticos de formación de las vesículas, aunque esta posibilidad se desconoce. Los filamentos de F-actina de neuronas expuestas a SPARC resultan más sensibles a la presencia de latrunculina-A, un agente despolimerizante (Figs. R40-R42). Este hecho viene posiblemente causado por una disposición o estructuración distinta de la actina comparada con la de sinapsis maduras. Las diferencias en el citoesqueleto de actina podrían estar afectando a la formación de las vesículas, ya que en sinapsis inmaduras, la endocitosis depende estrechamente de actina (Zhang & Benson, 2002; Nelson, et al., 2013). Estas evidencias podrían explicar la reducción de los depósitos de vesículas y la depresión sináptica observada. La Fig. D2 resume el efecto inhibitorio de SPARC a bajas concentraciones sobre la maduración sináptica, sin alterar el número de contactos sinápticos.

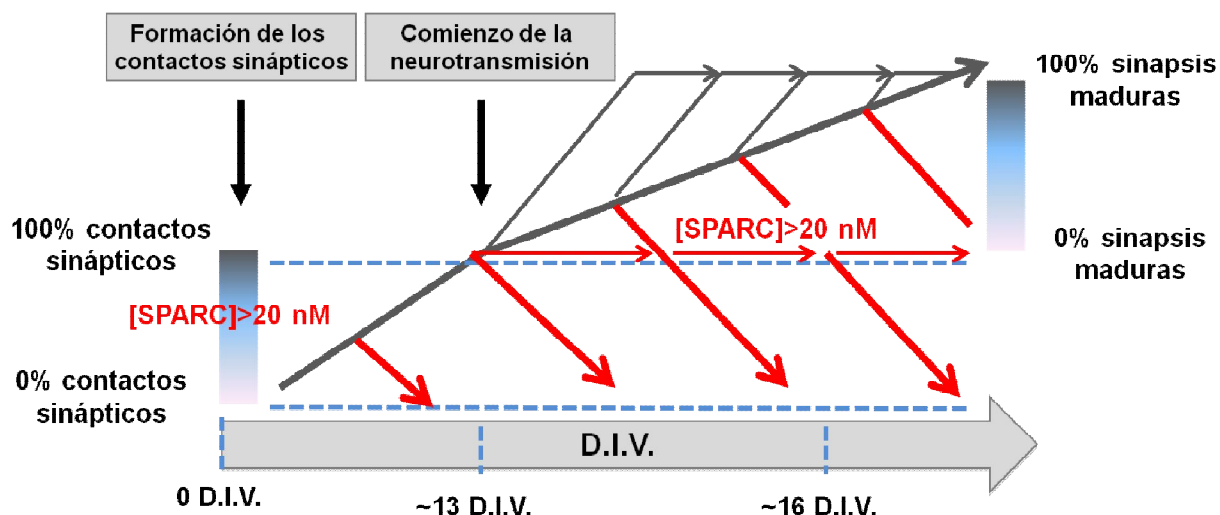


**Figura D2. SPARC a bajas concentraciones arresta a los terminales presinápticos en un estado de inmadurez.** Los SCMs tratados de forma crónica con SPARC < 10 nM, establecen contactos sinápticos que quedan retenidos en un fenotipo de inmadurez sináptica. La aplicación de SPARC < 10 nM de forma aguda sobre sinapsis ya desarrolladas, las traslada a la inmadurez, sin alterar el número de contactos sinápticos.

Cuando la concentración de SPARC aumenta, deja de observarse un fenotipo general de terminales inmaduros, y se evidencia una eliminación sináptica (Figs. R33-R34). Hasta ahora, no se conocían los factores encargados de desencadenar el proceso de refinamiento de las sinapsis. Como han demostrado algunos trabajos, los contactos sinápticos que van a eliminarse presentan una reducción de su potencia (Colman, et al., 1997) y un fenotipo depresivo (Wiegert & Oertner, 2013). Ambas características son propias de sinapsis inmaduras. De esta forma las mismas moléculas que antagonizan la sinaptogénesis o la madurez podrían ser las

responsables de la eliminación sináptica. En esta tesis se ha demostrado que SPARC puede actuar tanto como inhibidor de la maduración, como activador de eliminación, en función de su concentración efectiva en el entorno perisináptico. Al igual que pasaba con el fenotipo de inmadurez, el tratamiento agudo de SPARC a alta concentración es capaz de eliminar sinapsis ya desarrolladas (Figs. R50-R54).

En la Fig. D3 se resume el efecto de SPARC a altas concentraciones.



**Figura D3. SPARC a altas concentraciones elimina sinapsis.** Los SCMs tratados de forma crónica o aguda con SPARC > 20 nM, sufren un proceso de eliminación sináptica. Sin embargo, no se elimina la totalidad de las sinapsis, sino que las que quedan permanecen retenidas en un fenotipo de inmadurez sináptica.

Para profundizar en el mecanismo de acción de SPARC, se investigaron cuáles eran los dominios de la proteína responsables de las acciones observadas. SPARC es una proteína matricelular, como trombospondina 1 y tenascina C. Las tres proteínas tienen secuencias y conformaciones diferentes, pero poseen características propias de este grupo clasificado. Entre otras, se caracterizan por tener: propiedades antiadhesivas, una máxima expresión durante el desarrollo, un bajo nivel de expresión en los tejidos adultos, unión a diversos receptores de la superficie celular para modificar su forma a través de cambios en el citoesqueleto, y corte por metaloproteasas de la matriz extracelular que reconocen su estructura modular generando fragmentos con funciones propias (Murphy-Ullrich & Sage, 2014). Por ejemplo, SPARC participa en la pérdida de las adhesiones focales de las células endoteliales (Murphy-Ullrich, et al., 1995) y en el redondeamiento de las mismas células (Goldblum, et al., 1994).

Entre las metaloproteasas que cortan a SPARC se encuentran colagenasa 3, gelatinasa A, gelatinasa B y matrilisina, que generan un fragmento de 91 aa que

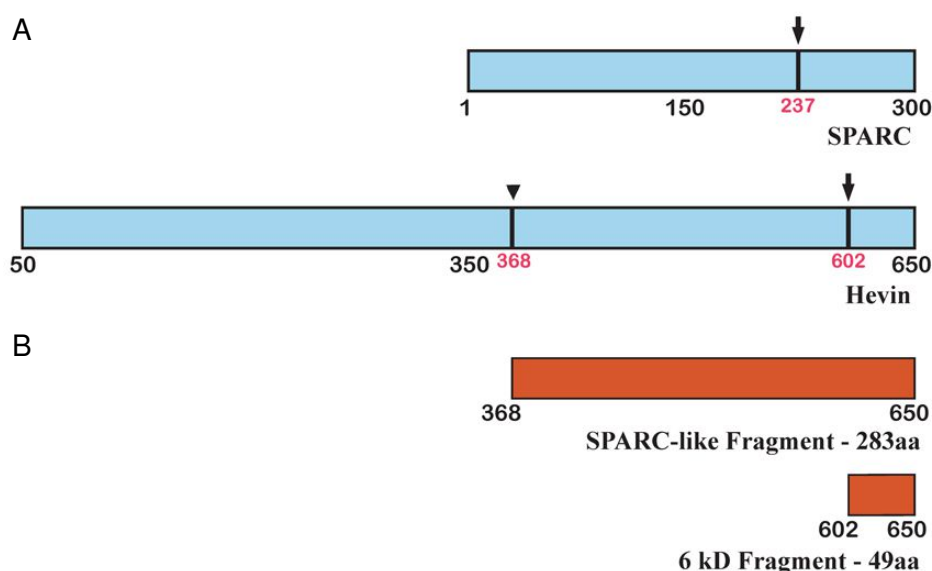
contiene los 20 aa del péptido 4.2 (EC-SPARC), usado en esta tesis (Lane, et al., 1994; Sage et al., 2003; Sasaki et al., 1997). Este péptido pertenece al dominio extracelular de unión a  $\text{Ca}^{+2}$  (EC) de SPARC. Asimismo, se pueden generar fragmentos que contienen otros péptidos, como el 2.1 (FL-SPARC), que pertenece al dominio folistatina (FL) de la proteína (Fig. I34-I35), y que también se ha utilizado en la presente tesis. Ambos son estables y bioactivos. Mientras el péptido 2.1 genera controversia en la capacidad de desensamblaje sobre células endoteliales y fibroblastos, (Lane & Sage, 1990; Murphy-Ullrich et al., 1995), el péptido 4.2 mimetiza la acción antiadhesiva de SPARC de forma evidente (Bradshaw, et al., 2003; Kupprion, et al., 1998). Es de especial relevancia, como sendas inyecciones de SPARC y del péptido 4.2 en embriones del *Xenopus leavis* generan el mismo efecto antiadhesivo evitando el esparcimiento de las células del mesodermo y redondeándolas (Huynh, et al., 1999).

Para conocer el dominio efector de SPARC, en esta tesis se hizo uso de los péptidos 2.1 y 4.2 (FL-SPARC y EC-SPARC, respectivamente). El conjunto de resultados muestra que, mientras el péptido FL-SPARC no genera ningún efecto sobre la neurotransmisión, EC-SPARC mimetiza exactamente la acción de la proteína completa, produciendo una eliminación sináptica de manera dosis-dependiente (Fig. R47). Por lo tanto, el dominio EC de SPARC es el dominio funcional de la proteína. La eliminación de las sinapsis colinérgicas generada por EC-SPARC, ocurre tanto en el tratamiento crónico como agudo del péptido sobre las sinapsis (Figs. R48-R54).

Aunque el péptido FL-SPARC resulta inerte en la neurotransmisión, nuestros experimentos sugieren que el dominio FL podría ejercer un papel regulador por diferentes motivos. Entre otros, porque la aplicación de FL-SPARC en competición con SPARC inhibe el efecto de éste sobre el citoesqueleto de actina (Fig. R45).

Es interesante que otras proteínas matricelulares, como hevin, agrina, testicano 1, SMOC 1 y Fstl 1 presenten homología en sus secuencias con SPARC, principalmente en el dominio FL (Bradshaw, 2012). En consecuencia, es posible que dependiendo del estado del desarrollo, la acción inhibitoria de SPARC venga antagonizada por los altos niveles de proteínas claramente sinaptogénicas, como agrina. Independientemente de posibles interacciones inter-proteicas, los resultados demuestran que el efecto sobre la eliminación sináptica recae en el dominio EC. A diferencia del dominio FL, no existen homologías a nivel del dominio EC con el resto

de las proteínas matricelulares, y por tanto, resulta improbable que ejerzan la misma función que SPARC. La única excepción es hevin (*SPARC-like 1*). Se trata de la proteína matricelular que presenta mayor homología en su secuencia con SPARC, y también es secretada por la glía. Ambas tienen un dominio de unión a colágeno similar al del receptor de la superficie celular DDR 2. Además, contienen un dominio EC con un 63% de homología y son reconocidas por metaloproteasas generando péptidos bioactivos (Bradshaw, 2012). De una manera muy simple, podemos decir que hevin sería la versión larga de SPARC (Fig. D4A). Paradójicamente en el sistema nervioso en desarrollo, hevin y SPARC desempeñan papeles antagónicos. A pesar de que colocalizan en la misma región, se ha demostrado que hevin ejerce un efecto sinaptogénico en hipocampo mientras que SPARC inhibe la acción de hevin (Kucukdereli et al., 2011).



**Figura D4. Homología de las proteínas matricelulares SPARC y hevin.** A) Diagrama de las secuencias de SPARC y hevin. La cabeza de flecha (aa 368) indica un sitio de corte exclusivo de hevin por la metaloproteasa MMP3. Las flechas indican sitios homólogos de corte en hevin y SPARC por MMP3. B) Diagrama de los productos de la digestión de la metaloproteasa MMP3 en hevin. Ambos incluyen la secuencia del péptido 4.2, del dominio EC de SPARC. Modificado de (Weaver et al., 2011).

Este hecho se evidencia cuando la proteína se corta por la metaloproteasa MMP 3 generando un fragmento que contiene al péptido 4.2 de SPARC (Fig. D4B, Weaver et al., 2011). Se ha visto como dicho fragmento compite con la propia hevin en su efecto sinaptogénico de la misma manera que lo hace SPARC. Por lo tanto, se sugiere que la acción de SPARC añadida a la de los fragmentos generados de los dominios EC de SPARC y hevin, podrían incrementar la concentración efectiva para llevar a cabo el "efecto SPARC". Así, paralelamente al equilibrio entre las proteínas

completas y escindidas, dada su expresión coincidente durante el desarrollo, los niveles de ambas podrían ser importantes para decidir qué contactos sinápticos deben ser formados y cuáles eliminados.

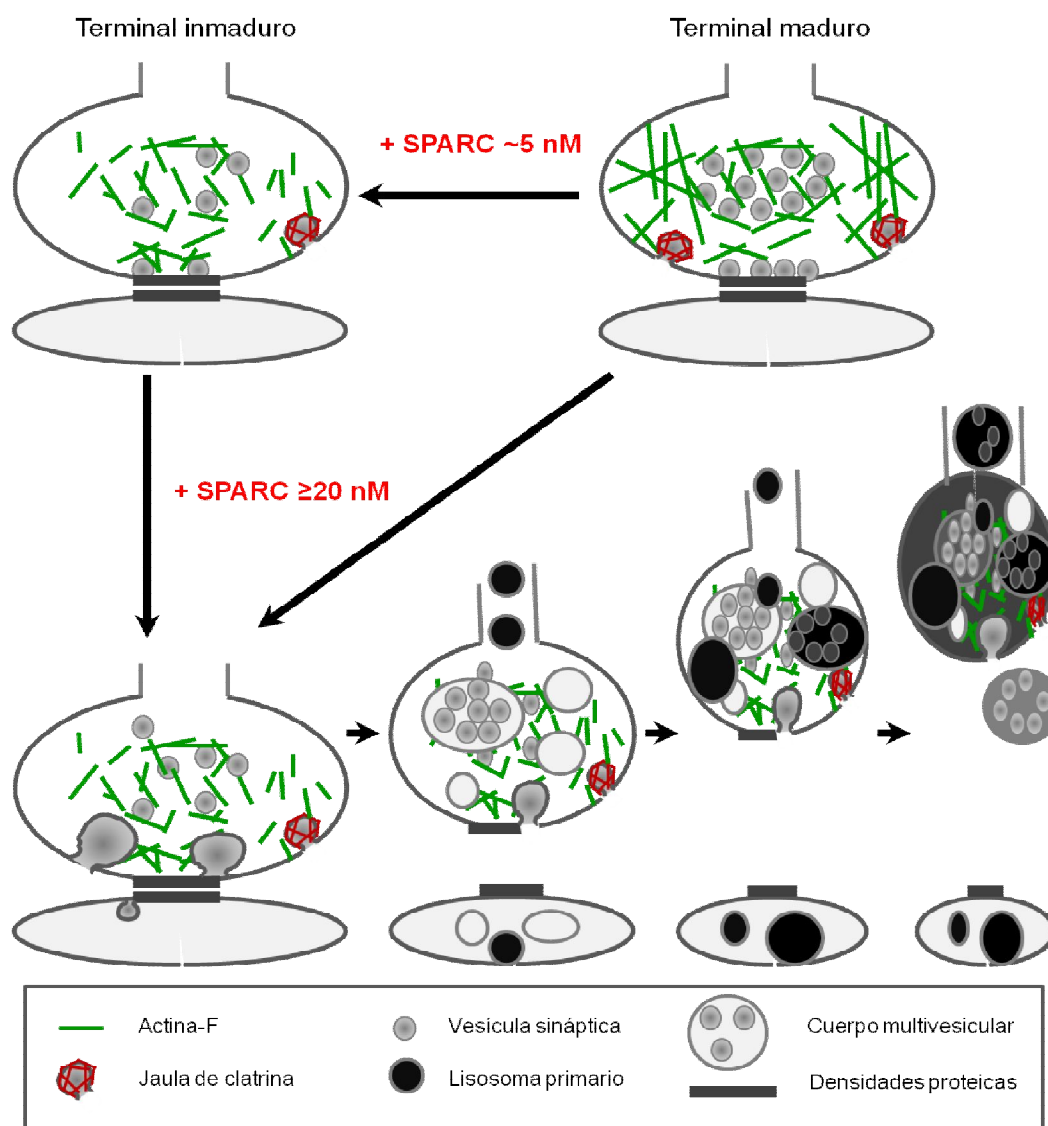
El "efecto SPARC", reside en la unión a un mismo receptor. Se ha propuesto el complejo de integrinas  $\alpha 5 \beta 1$ , pues se unen tanto SPARC como el péptido 4.2 (Nie et al., 2008; Nie & Sage, 2009). Además, este complejo se expresa en la zona activa de las NMJs de *Xenopus* (Cohen, Hoffstrom, & DeSimone, 2000), participa en la eliminación de las adhesiones focales mediada por SPARC (Murphy-Ullrich et al., 1995) y en el redondeamiento de las mismas células (Goldblum et al., 1994). También, la subunidad  $\beta 1$  de integrinas se expresa ampliamente en el SCG (DeFreitas et al., 1995). En el conjunto de nuestros resultados, la unión de SPARC a este receptor explicaría el efecto observado sobre el citoesqueleto de actina en los SCMs, tanto en el fenotipo de inmadurez (Figs. R41-R42), como en el fenotipo de eliminación (Fig. R54), pues existe una relación entre las integrinas y la estabilidad sináptica mediada por el citoesqueleto de actina (Nelson et al., 2013). También, la acción de SPARC a través de integrinas podría justificar su efecto sobre el citoesqueleto de tubulina y las retracciones axónicas de las NMJs de la cola del *Xenopus tropicalis* (Figs. R59-R60).

El "efecto SPARC" sobre las sinapsis para eliminarlas comienza con una endocitosis masiva de la superficie plasmática que desorganiza las zonas activas y los depósitos de vesículas sinápticas. Como consecuencia se forman estructuras endosomales y cuerpos multivesiculares (Figs. R52 y R56), a la vez que se reduce el tamaño del terminal presináptico, que adquiere una forma de bulbo de retracción (Fig. R56 y R60). La evidencia de este proceso en neuronas crecidas en ausencia de glía respalda la idea de un mecanismo autónomo de la célula, "*cell-autonomous*", ya que los resultados demuestran un incremento de la presencia de lisosomas en los terminales axónicos y un aumento de su diámetro como consecuencia de la fusión con las estructuras membranosas generadas (Fig. R55-R56). Sin embargo, no se excluye la posibilidad de la fagocitosis por parte de las células gliales en renacuajos de *Xenopus tropicalis*, a partir de la formación de exosomas inducidos durante la retracción axonal mediada por SPARC (Fig. R59-R60).

El conjunto de los resultados obtenidos en los SCMs reproducen temporalmente los fenómenos observados en otros modelos descritos de eliminación de sinapsis colinérgicas, como en la NMJ de ratón (Song et al., 2008): 1. endocitosis



masiva; 2. desorganización de los depósitos de vesículas; 3. maduración de los endosomas para formar CMV y fenómenos de autofagocitosis; 4. trasiego de lisosomas hacia los terminales presinápticos para fusionarse y generar lisosomas secundarios o autolisosomas; 5. desensamblaje de los terminales presinápticos generando bulbos de retracción; 6. trasiego de CMVs y lisosomas secundarios hacia el soma; 7. eliminación sináptica y generación de exosomas. La Fig. D5 resume el orden de los eventos durante la eliminación sináptica.



**Figura D5. Modelo de la eliminación sináptica mediada por SPARC en los SCMs.** El tratamiento de los SCMs con una baja concentración de SPARC arresta a los terminales en un estado inmaduro. El tratamiento con una elevada concentración de SPARC, hace a las sinapsis susceptibles de ser eliminadas. SPARC desencadena una endocitosis masiva de la superficie pre-y post-sináptica, que forman estructuras membranosas, un trasiego de lisosomas (vesículas negras) para iniciar la vía degradativa, la retracción axónica y la eliminación sináptica.

La eliminación es un proceso selectivo, ya que el tratamiento crónico con SPARC a alta concentración reduce significativamente, pero no elimina por completo

la totalidad de las sinapsis del SCM. A partir de los resultados nos preguntamos, es decir ¿está dictando la glía la eliminación selectiva de las sinapsis?, o por el contrario ¿son las neuronas quienes deciden en última instancia ser o no ser eliminadas?. Esta condición se relacionaría con la expresión selectiva del/os receptor/es de SPARC en sus sinapsis.

Independientemente de la capacidad de decisión de SPARC sobre la eliminación de las sinapsis, nuestros resultados evidencian que en las condiciones apropiadas y con una relevancia biológica, esta proteína extracelular es capaz de controlar el tráfico de membranas intracelular, que afecta a los depósitos de vesículas.

Los resultados obtenidos y las evidencias conocidas, demuestran que el tamaño de los depósitos de vesículas varía durante la maduración de las sinapsis. El número de vesículas es un factor limitante para la transmisión nerviosa, y la endocitosis es el mecanismo responsable de la generación de las vesículas. Por tanto, se sugiere que la endocitosis está regulada durante la maduración.

Teniendo en cuenta que CME es el principal mecanismo de endocitosis de cualquier sinapsis (Royle & Lagnado, 2010; Saheki & De Camilli, 2012), en el presente trabajo nos centramos en desarrollar un método para poder estudiar mejor esta vía durante el desarrollo sináptico. El objetivo final era poder asociar los efectos de SPARC con CME, pero el volumen y complejidad de los resultados obtenidos deja abierta esta cuestión para futuros trabajos. La relevancia de los niveles de clatrina, como proteína específica de CME, ha sido estudiada en esta tesis, sobre neuronas maduras. Los efectos se han evidenciado particularmente sobre la plasticidad sináptica, y la consideración de la concentración presináptica de clatrina como un factor limitante para mantener la neurotransmisión.

Clásicamente se había considerado que debía existir un depósito ilimitado de clatrina en las sinapsis, pues serían requeridos niveles altos de la proteína para mantener la neurotransmisión. Por ejemplo, la formación de un único CCP requiere de 36-60 *triskelion* (Cheng, et al., 2007). Además, clatrina es muy abundante en neuronas, 0.75% del total (Goud, et al., 1985), y se encuentra principalmente acumulada en sinapsis (Saheki & De Camilli, 2012).

Nuestros resultados desmienten las hipótesis clásicas. La disponibilidad de clatrina no es constante en el terminal presináptico, sino que disminuye durante períodos de actividad neuronal en función de la fuerza de la estimulación y la

probabilidad de liberación (Figs. R9-R10). Durante la exocitosis se produce un movimiento lateral de las membranas fusionadas con la superficie hacia la zona periaxial, donde comienza la endocitosis (Heuser & Reese, 1973). Puesto que el mecanismo CME tiene una  $\tau \sim 15$  s (Balaji et al., 2008), el balance exo-endocitosis se mantiene a bajas frecuencias de actividad. Pero durante una estimulación prolongada, la elevada exocitosis provoca que la membrana fusionada se aleje de los sitios normales de endocitosis, saliendo incluso del terminal (Saheki & De Camilli, 2012). Este desplazamiento lateral de los "cargos" fuera de la sinapsis, debe ir acompañado también de las proteínas endocíticas que se desplazan a estas regiones alejadas para hacer la endocitosis (Fig. R9). Además, la dispersión de las proteínas endocíticas dentro y fuera del terminal, supondría la bajada de su concentración efectiva en cada punto donde se forme un CCP. Las consecuencias afectarían a la formación de las vesículas y a la neurotransmisión (Poudel & Bai, 2014). Por ejemplo, en neuronas de hipocampo, 400 estímulos a 20 Hz reducen ~4% la clatrina disponible en el botón presináptico (figura I19, Granseth, et al., 2006). En nuestros resultados, 2000 estímulos a 20 Hz causan una salida del terminal de entre ~5% y 15% de la clatrina total, dependiendo de que la sinapsis opere a una probabilidad de liberación normal o alta (Fig. R10). Sin embargo, este movimiento fuera de la sinapsis durante la estimulación, supondría un límite inferior a la disminución real de la clatrina disponible en la sinapsis, ya que durante la estimulación, parte de los *triskelion* se encuentran formando jaulas que tamponan su disponibilidad.

El seguimiento de GFP-nLCa demuestra que el movimiento de clatrina observado durante el período de actividad es reversible. Pocos segundos tras la estimulación, clatrina regresa al terminal (Fig. R10). Por tanto, existe un "*knock-down*" transitorio de clatrina en el terminal presináptico durante un período de estimulación sostenida.

Nuestros resultados contradicen los obtenidos en un estudio previo realizado en neuronas cultivadas de hipocampo, donde la actividad sináptica se induce mediante estimulación de campo eléctrico (750 estímulos a 20 Hz) o con 90 mM de KCl (Mueller, et al., 2004). En este trabajo se describe una acumulación de clatrina en los botones sinápticos durante el período de actividad, y una disminución en las regiones perisinápticas. Casualmente en nuestro modelo, también observamos una acumulación de clatrina en los terminales presinápticos, pero sólo en aquellas

neuronas que han sido previamente estimuladas intensamente, y por tanto, donde clatrina ya ha habido difundido fuera de las sinapsis. Además, en las sinapsis de los SCMs somos capaces de controlar los estímulos aplicados, ya que estamos en un circuito monosináptico. Pero en un cultivo masivo no se conoce la cantidad de potenciales de acción que le llega a una determinada neurona, debido a la innervación polisináptica existente.

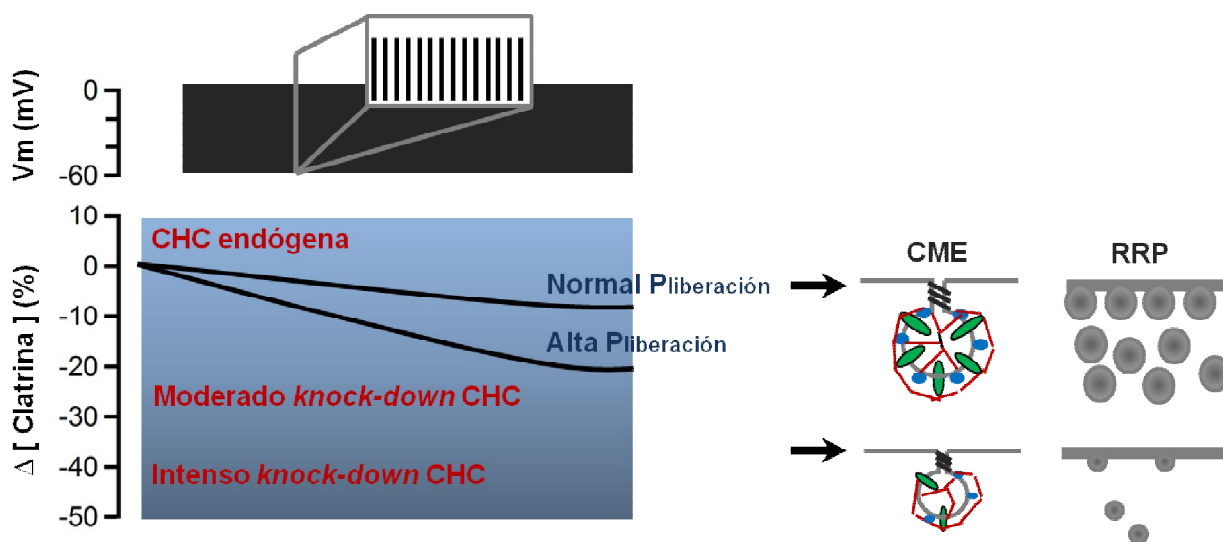
El "*knock-down*" transitorio de clatrina durante un período de actividad, tiene efectos significativos sobre la neurotransmisión. En nuestro sistema, las neuronas estimuladas más de 1.5 min a 20 Hz, sufren una reducción transitoria del ~30% en el tamaño del RRP (Fig. R7), y una disminución de >20% en la amplitud de los mEPSCs (Fig. R6). La importancia directa de clatrina se observa mediante la diálisis de clatrina exógena purificada. Su aplicación evita la depresión del RRP durante el mismo período de estimulación (Fig. R30). Este resultado aunque inesperado debido a su gran eficiencia, es el hecho que nos ha llevado a considerar los niveles de clatrina como un factor esencial de la fisiología presináptica. Similarmente, el estudio correlativo de las respuestas y ultraestructura sináptica tras la reducción de los niveles endógenos de clatrina mediante el uso de un RNAi para CHC, es clave para defender este concepto.

Una caída aparentemente pequeña del ~20%, que como hemos descrito puede ocurrir durante un período de estimulación intensa, produce una reducción del ~40% de las respuestas postsinápticas. Este resultado avala un estudio previo realizado en una línea celular (Moskowitz, et al., 2005). Experimentalmente se establecen dos situaciones diferentes: un *knock-down* moderado (<30% de caída de CHC endógena) y un *knock-down* intenso (>30%).

En condiciones de un *knock-down* moderado, se observa una reducción de más de dos veces en el tamaño del RRP (Fig. R19). Este depósito resulta muy sensible a los niveles de clatrina, y afecta a la depresión a corto plazo estimada por el protocolo de pulsos pareados (Fig. R17). Paralelamente, nuestros resultados también observan una reducción de la densidad de vesículas citoplasmáticas, que puede alcanzar un 40% en condiciones de una fuerte reducción de la clatrina endógena (Fig. R20-R22). La depresión observada es similar a otros estudios en los que se bloquea el mecanismo CME, como en *Drosophila shibire* sometida a una temperatura no permisiva (Koenig & Ikeda, 1989), o con la fotoinactivación de CLC unida a FIAsh-FALI (Heerssen, et al., 2008).

En condiciones de intenso *knock-down* de la clatrina endógena, se observa además, una disminución de la frecuencia de la neurotransmisión espontánea (Fig. R25) y una reducción del 80% en el tamaño cuantal (Fig. R26). Ambos fenómenos también estarían contribuyendo a la depresión sináptica (Fig. R17).

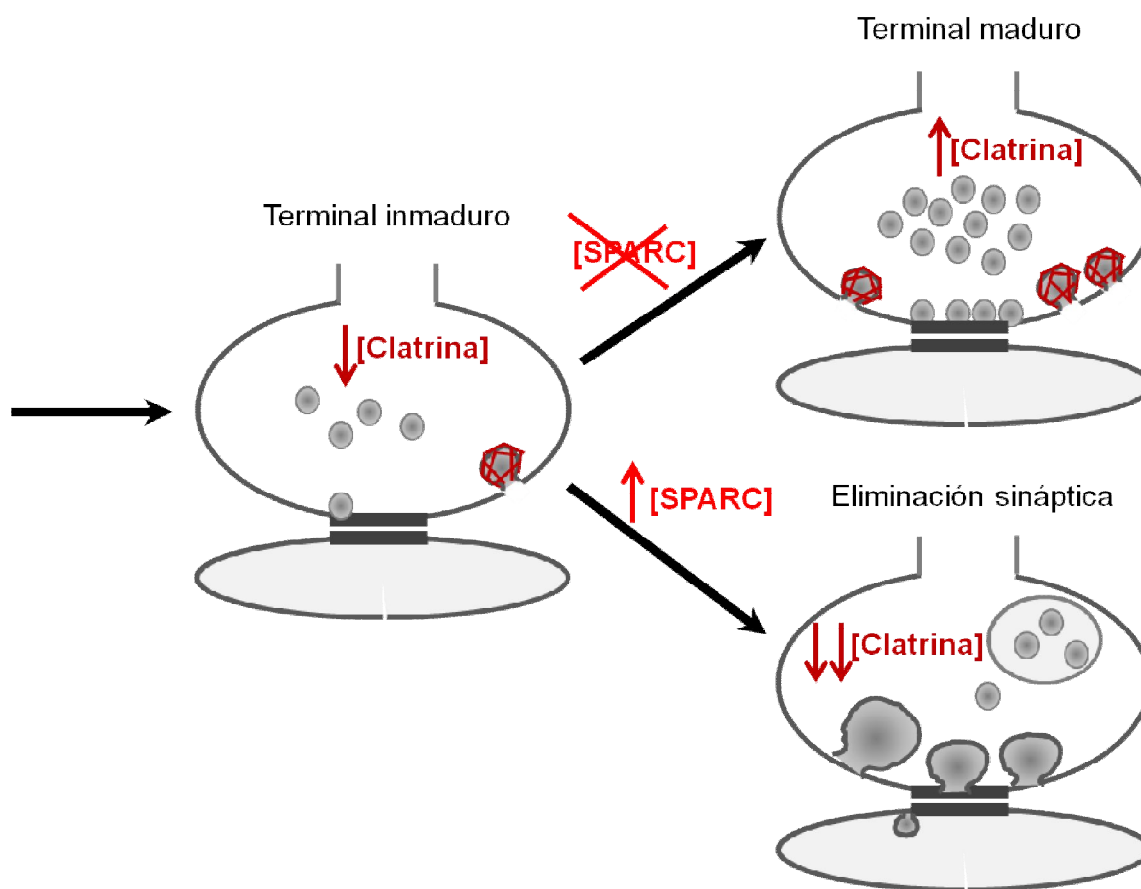
A modo de resumen, podemos ver los efectos de los niveles de clatrina sobre la función presináptica en la figura D6.



**Figura D6. Los niveles presinápticos de clatrina varían en períodos de actividad en función de la probabilidad de liberación y de la fuerza de la estimulación.** Los terminales presinápticos sometidos a una fuerte actividad exocítica, sufren una reducción de los niveles disponibles de clatrina que se mueve de forma reversible fuera de la sinapsis. Este *knock-down* transitorio de clatrina es mayor en terminales que operan a alta probabilidad de liberación. Una reducción moderada de los niveles endógenos de clatrina afecta principalmente al número de vesículas de los depósitos presinápticos. Pero una reducción intensa afecta tanto a la cantidad como a la calidad de las vesículas, favoreciendo fuertemente la depresión sináptica.

En esta tesis se ha caracterizado el papel de los niveles de las proteínas clatrina y SPARC sobre la neurotransmisión. Como hemos visto, SPARC reduce los depósitos de vesículas y favorece la generación de endosomas, afectando a la estructura del citoesqueleto de actina. Por todo ello, podemos considerar a SPARC como una molécula potencialmente capaz de influenciar los fenómenos de endocitosis. Recientemente, se ha observado como la proteína *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), también extracelular, actúa sobre *bulk-endocytosis* (Smillie et al., 2013). Los niveles de clatrina disponibles resultan el factor limitante para el mecanismo de CME, cuya inhibición afecta a la densidad de vesículas en los terminales presinápticos y activa otros mecanismos de reciclaje masivo. Consecuentemente, debe existir un fuerte control sobre los niveles de la proteína. En este contexto, planteamos la hipótesis en la que SPARC, una proteína altamente regulada durante el desarrollo, reduce los niveles sinápticos de clatrina, y ésta es la

clave para retener la formación de los depósitos de vesículas sinápticas, ó para desencadenar un programa de endocitosis masiva, "*bulk-endocytosis*", que finalice con la eliminación selectiva de las sinapsis (Fig. D7).



**Figura D7. Hipótesis de la regulación de SPARC de los niveles sinápticos de clatrina.** La hipótesis propone que los terminales presinápticos inmaduros contienen un nivel relativamente bajo de clatrina. Este hecho impide que se generen unos depósitos de vesículas grandes. La maduración es efectiva si los niveles de SPARC son bajos (o bien los niveles de proteínas sinaptogénicas son más elevados que los de SPARC). Este hecho permite elevar los niveles de clatrina y desarrollar los depósitos de vesículas sinápticas. Si por el contrario, la concentración de SPARC es alta, se genera una reducción de los niveles de clatrina. Como consecuencia se favorece la "*bulk-endocytosis*" como mecanismo prioritario de endocitosis, hecho que finaliza con la eliminación sináptica.

Los experimentos futuros deberán explicar el modelo planteado. De ser así, las observaciones de esta tesis habrían abierto una nueva vía en la comunicación glía-neurona para entender interacciones moleculares clave del desarrollo sináptico.



# CONCLUSIONES

*"Los hombres geniales empiezan grandes obras, los hombres trabajadores las terminan"*

Leonardo da Vinci





1. Los cultivos autápticos de neuronas colinérgicas del ganglio cervical superior de rata, suponen un buen modelo para el estudio de la plasticidad sináptica en ausencia de glía.
2. Tras el comienzo de la neurotransmisión, las sinapsis colinérgicas *in vitro* sufren cambios funcionales que las hacen pasar de un fenotipo inmaduro a maduro, aumentando el tamaño del depósito de liberación rápida, y disminuyendo la depresión sináptica a corto plazo.
3. La estimulación continuada de las sinapsis colinérgicas *in vitro* favorece un fenotipo de depresión debido a la salida de clatrina endógena del terminal presináptico, generando un *knock-down* transitorio, que reduce el número de vesículas del depósito de liberación rápida y la amplitud cuantal.
4. El uso de RNAi supone un buen método para modificar los niveles endógenos de clatrina en las sinapsis colinérgicas *in vitro*, imitando los cambios observados durante una estimulación sostenida.
5. Los niveles endógenos de clatrina afectan principalmente al terminal presináptico y ejercen un papel altamente cooperativo sobre la neurotransmisión, modificando funcional y morfológicamente la organización y el tamaño de las vesículas.
6. La diálisis de clatrina exógena, rescata el fenotipo *knock-down* de clatrina, y previene la depresión sináptica a corto plazo de las neuronas autápticas control cuando son sometidas a una estimulación continuada.
7. SPARC es una proteína altamente conservada entre especies, liberada por la glía durante el desarrollo, presentando un pico de expresión en el ganglio cervical superior de la rata y en la cola del *Xenopus tropicalis*, que coincide con el período de eliminación sináptica.
8. SPARC afecta de manera dosis dependiente a la plasticidad sináptica, ya que a baja concentración retiene a los terminales presinápticos en un estado de

inmadurez, y a alta concentración desencadena un mecanismo autónomo de eliminación de sinapsis.

9. El fenotipo de SPARC sobre la inmadurez sináptica *in vitro* se origina a partir de la reducción del tamaño de los depósitos funcionales de vesículas favoreciendo la depresión a corto plazo, y la alteración del citoesqueleto de actina presináptica.

10. El efecto de SPARC sobre la eliminación sináptica *in vitro* comienza con una endocitosis masiva en los terminales pre- y postsinápticos, y la consecutiva degradación vía lisosomal de las estructuras endosomales formadas.

11. SPARC tiene una estructura modular, en la que el dominio EC es el efector de las funciones sinápticas de la proteína.

12. *In vivo*, la inyección de SPARC elimina las uniones neuromusculares de la cola del renacuajo del *Xenopus tropicalis* en ~5 horas, generando una parálisis que revierte con la re-formación de los contactos sinápticos, 6 días después.

13. Los niveles intracelulares de clatrina y la concentración extracelular de SPARC, son factores determinantes de la función presináptica.

# BIBLIOGRAFÍA

*"La poesía no quiere adeptos, quiere amantes"*

Federico García Lorca



- Albrecht, D., López-Murcia, F. J., Pérez-González, A. P., Lichtner, G., Solsona, C., & Llobet, A. (2012). SPARC prevents maturation of cholinergic presynaptic terminals. *Mol Cell Neurosci*, 49(3), 364-374. doi: 10.1016/j.mcn.2012.01.005
- Allen, N. J. (2013). Role of glia in developmental synapse formation. *Curr Opin Neurobiol*, 23(6), 1027-1033. doi: 10.1016/j.conb.2013.06.004
- Alvarez de Toledo, G., Fernández-Chacón, R., & Fernández, J. M. (1993). Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature*, 363(6429), 554-558. doi: 10.1038/363554a0
- Andreae, L. C., Fredj, N. B., & Burrone, J. (2012). Independent vesicle pools underlie different modes of release during neuronal development. *J Neurosci*, 32(5), 1867-1874. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5181-11.2012
- Aravanis, A. M., Pyle, J. L., & Tsien, R. W. (2003). Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature*, 423(6940), 643-647. doi: 10.1038/nature01686
- Armbruster, M., & Ryan, T. A. (2011). Synaptic vesicle retrieval time is a cell-wide rather than individual-synapse property. *Nat Neurosci*, 14(7), 824-826. doi: 10.1038/nn.2828
- Arsenault, D., & Zhang, Z. W. (2006). Developmental remodelling of the lemniscal synapse in the ventral basal thalamus of the mouse. *J Physiol*, 573(Pt 1), 121-132. doi: 10.1113/jphysiol.2006.106542
- Artalejo, C. R., Henley, J. R., McNiven, M. A., & Palfrey, H. C. (1995). Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca<sup>2+</sup>, GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(18), 8328-8332.
- Atluri, P. P., & Ryan, T. A. (2006). The kinetics of synaptic vesicle reacidification at hippocampal nerve terminals. *J Neurosci*, 26(8), 2313-2320. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4425-05.2006
- Au, E., Richter, M. W., Vincent, A. J., Tetzlaff, W., Aebbersold, R., Sage, E. H., & Roskams, A. J. (2007). SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J Neurosci*, 27(27), 7208-7221. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0509-07.2007
- Baixauli, F., López-Otín, C., & Mittelbrunn, M. (2014). Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. *Front Immunol*, 5, 403. doi: 10.3389/fimmu.2014.00403
- Balaji, J., Armbruster, M., & Ryan, T. A. (2008). Calcium control of endocytic capacity at a CNS synapse. *J Neurosci*, 28(26), 6742-6749. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1082-08.2008
- Balaji, J., & Ryan, T. A. (2007). Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(51), 20576-20581. doi: 10.1073/pnas.0707574105
- Bashkirov, P. V., Akimov, S. A., Evseev, A. I., Schmid, S. L., Zimmerberg, J., & Frolov, V. A. (2008). GTPase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. *Cell*, 135(7), 1276-1286. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.028
- Bekkers, J. M. and C. F. Stevens (1991). "Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(17): 7834-7838.
- Bethani, I., Werner, A., Kadian, C., Geumann, U., Jahn, R., & Rizzoli, S. O. (2009). Endosomal fusion upon SNARE knockdown is maintained by residual SNARE activity and enhanced docking. *Traffic*, 10(10), 1543-1559. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00959.x
- Bhoopathi, P., Gondi, C. S., Gujrati, M., Dinh, D. H., & Lakka, S. S. (2011). SPARC mediates Src-induced disruption of actin cytoskeleton via inactivation of small GTPases Rho-Rac-Cdc42. *Cell Signal*, 23(12), 1978-1987. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.07.008

- Bishop, D. L., Misgeld, T., Walsh, M. K., Gan, W. B., & Lichtman, J. W. (2004). Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding. *Neuron*, 44(4), 651-661. doi: 10.1016/j.neuron.2004.10.026
- Birks, R. I., & Isacoff, E. Y. (1988). Burst-patterned stimulation promotes nicotinic transmission in isolated perfused rat sympathetic ganglia. *J Physiol*, 402, 515-532.
- Bittner, G. D., & Kennedy, D. (1970). Quantitative aspects of transmitter release. *J Cell Biol*, 47(3), 585-592.
- Bleckert, A., Photowala, H., & Alford, S. (2012). Dual pools of actin at presynaptic terminals. *J Neurophysiol*, 107(12), 3479-3492. doi: 10.1152/jn.00789.2011
- Bloom, O., Evergren, E., Tomilin, N., Kjaerulff, O., Löw, P., Brodin, L., . . . Shupliakov, O. (2003). Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol*, 161(4), 737-747. doi: 10.1083/jcb.200212140
- Bornstein, P. (1995). Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol*, 130(3), 503-506.
- Bornstein, P., & Sage, E. H. (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol*, 14(5), 608-616.
- Bourne, J., Morgan, J. R., & Pieribone, V. A. (2006). Actin polymerization regulates clathrin coat maturation during early stages of synaptic vesicle recycling at lamprey synapses. *J Comp Neurol*, 497(4), 600-609. doi: 10.1002/cne.21006
- Bradshaw, A. D., Graves, D. C., Motamed, K., & Sage, E. H. (2003). SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10), 6045-6050. doi: 10.1073/pnas.1030790100
- Bradshaw, A. D., Puolakkainen, P., Dasgupta, J., Davidson, J. M., Wight, T. N., & Helene Sage, E. (2003). SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. *J Invest Dermatol*, 120(6), 949-955. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12241.x
- Bradshaw, A. D., & Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest*, 107(9), 1049-1054. doi: 10.1172/JCI12939
- Branco, T., & Staras, K. (2009). The probability of neurotransmitter release: variability and feedback control at single synapses. *Nat Rev Neurosci*, 10(5), 373-383. doi: 10.1038/nrn2634
- Brekken, R. A., & Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol*, 19(8), 816-827.
- Brodin, L., & Shupliakov, O. (2006). Giant reticulospinal synapse in lamprey: molecular links between active and periaxonal zones. *Cell Tissue Res*, 326(2), 301-310. doi: 10.1007/s00441-006-0216-2
- Brown, D. D., & Cai, L. (2007). Amphibian metamorphosis. *Dev Biol*, 306(1), 20-33. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.03.021
- Burrone, J., Neves, G., Gomis, A., Cooke, A., & Lagnado, L. (2002). Endogenous calcium buffers regulate fast exocytosis in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron*, 33(1), 101-112.
- Böcking, T., Aguet, F., Harrison, S. C., & Kirchhausen, T. (2011). Single-molecule analysis of a molecular disassemblase reveals the mechanism of Hsc70-driven clathrin uncoating. *Nat Struct Mol Biol*, 18(3), 295-301. doi: 10.1038/nsmb.1985
- Ceccarelli, B., Hurlbut, W. P., & Mauro, A. (1972). Depletion of vesicles from frog neuromuscular junctions by prolonged tetanic stimulation. *J Cell Biol*, 54(1), 30-38.
- Chappie, J. S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S. L., & Dyda, F. (2010). G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature*, 465(7297), 435-440. doi: 10.1038/nature09032
- Chen, C., & Regehr, W. G. (2000). Developmental remodeling of the retinogeniculate synapse. *Neuron*, 28(3), 955-966.

- Cheng, Y., Boll, W., Kirchhausen, T., Harrison, S. C., & Walz, T. (2007). Cryo-electron tomography of clathrin-coated vesicles: structural implications for coat assembly. *J Mol Biol*, 365(3), 892-899. doi: 10.1016/j.jmb.2006.10.036
- Cheung, G., & Cousin, M. A. (2013). Synaptic vesicle generation from activity-dependent bulk endosomes requires calcium and calcineurin. *J Neurosci*, 33(8), 3370-3379. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4697-12.2013
- Cheung, G., Jupp, O. J., & Cousin, M. A. (2010). Activity-dependent bulk endocytosis and clathrin-dependent endocytosis replenish specific synaptic vesicle pools in central nerve terminals. *J Neurosci*, 30(24), 8151-8161. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0293-10.2010
- Chi, P., Greengard, P., & Ryan, T. A. (2003). Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. *Neuron*, 38(1), 69-78.
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C., Mullowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., . . . Barres, B. A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120(3), 421-433. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.020
- Chung, W. S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: 10.1101/cshperspect.a020370
- Chung, C., Barylko, B., Leitz, J., Liu, X., & Kavalali, E. T. (2010). Acute dynamin inhibition dissects synaptic vesicle recycling pathways that drive spontaneous and evoked neurotransmission. *J Neurosci*, 30(4), 1363-1376. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3427-09.2010
- Chung, W. S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., . . . Barres, B. A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504(7480), 394-400. doi: 10.1038/nature12776
- Cingolani, L. A., & Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci*, 9(5), 344-356. doi: 10.1038/nrn2373
- Clayton, E. L., & Cousin, M. A. (2009). The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurochem*, 111(4), 901-914. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06384.x
- Clayton, E. L., Sue, N., Smillie, K. J., O'Leary, T., Bache, N., Cheung, G., . . . Cousin, M. A. (2010). Dynamin I phosphorylation by GSK3 controls activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *Nat Neurosci*, 13(7), 845-851. doi: 10.1038/nn.2571
- Cochilla, A. J., Angleson, J. K., & Betz, W. J. (1999). Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. *Annu Rev Neurosci*, 22, 1-10. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.1
- Cocucci, E., Aguet, F., Boulant, S., & Kirchhausen, T. (2012). The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell*, 150(3), 495-507. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.047
- Coggan, J. S., Grutzendler, J., Bishop, D. L., Cook, M. R., Gan, W., Heym, J., & Lichtman, J. W. (2004). Age-associated synapse elimination in mouse parasympathetic ganglia. *J Neurobiol*, 60(2), 214-226. doi: 10.1002/neu.20022
- COLE, K. S. (1949). Some physical aspects of bioelectric phenomena. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 35(10), 558-566.
- Colman, H., Nabekura, J., & Lichtman, J. W. (1997). Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. *Science*, 275(5298), 356-361.
- Cousin, M. A. (2009). Activity-dependent bulk synaptic vesicle endocytosis--a fast, high capacity membrane retrieval mechanism. *Mol Neurobiol*, 39(3), 185-189. doi: 10.1007/s12035-009-8062-3
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R., Lüthi, A., Kim, W. T., Takei, K., . . . De Camilli, P. (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*, 99(2), 179-188.



- Crowley, C., Spencer, S. D., Nishimura, M. C., Chen, K. S., Pitts-Meek, S., Armanini, M. P., . . . Levinson, A. D. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell*, 76(6), 1001-1011.
- Damjanovski, S., Liu, F., & Ringuette, M. (1992). Molecular analysis of *Xenopus laevis* SPARC (Secreted Protein, Acidic, Rich in Cysteine). A highly conserved acidic calcium-binding extracellular-matrix protein. *Biochem J*, 281 ( Pt 2), 513-517.
- Damjanovski, S., Malaval, L., & Ringuette, M. J. (1994). Transient expression of SPARC in the dorsal axis of early *Xenopus* embryos: correlation with calcium-dependent adhesion and electrical coupling. *Int J Dev Biol*, 38(3), 439-446.
- Darabid, H., Arbour, D., & Robitaille, R. (2013). Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci*, 33(4), 1297-1313. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2935-12.2013
- Darcy, K. J., Staras, K., Collinson, L. M., & Goda, Y. (2006). Constitutive sharing of recycling synaptic vesicles between presynaptic boutons. *Nat Neurosci*, 9(3), 315-321. doi: 10.1038/nn1640
- De Simoni, A., Griesinger, C. B., & Edwards, F. A. (2003). Development of rat CA1 neurones in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J Physiol*, 550(Pt 1), 135-147. doi: 10.1113/jphysiol.2003.039099
- DEL CASTILLO, J., & KATZ, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol*, 124(3), 560-573.
- Delany, A. M., Kalajzic, I., Bradshaw, A. D., Sage, E. H., & Canalis, E. (2003). Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology*, 144(6), 2588-2596. doi: 10.1210/en.2002-221044
- Delgado, R., Maureira, C., Oliva, C., Kidokoro, Y., & Labarca, P. (2000). Size of vesicle pools, rates of mobilization, and recycling at neuromuscular synapses of a *Drosophila* mutant, shibire. *Neuron*, 28(3), 941-953.
- Denker, A., Kröhnert, K., & Rizzoli, S. O. (2009). Revisiting synaptic vesicle pool localization in the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Physiol*, 587(Pt 12), 2919-2926. doi: 10.1113/jphysiol.2009.170985
- Denker, A., & Rizzoli, S. O. (2010). Synaptic vesicle pools: an update. *Front Synaptic Neurosci*, 2, 135. doi: 10.3389/fnsyn.2010.00135
- Dillon, C., & Goda, Y. (2005). The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci*, 28, 25-55. doi: 10.1146/annurev.neuro.28.061604.135757
- Dittman, J., & Ryan, T. A. (2009). Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 133-160. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113302
- Dittman, J. S., Kreitzer, A. C., & Regehr, W. G. (2000). Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *J Neurosci*, 20(4), 1374-1385.
- Dobrunz, L. E., & Stevens, C. F. (1997). Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron*, 18(6), 995-1008.
- Doxsey, S. J., Brodsky, F. M., Blank, G. S., & Helenius, A. (1987). Inhibition of endocytosis by anti-clathrin antibodies. *Cell*, 50(3), 453-463.
- Edeling, M. A., Smith, C., & Owen, D. (2006). Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(1), 32-44. doi: 10.1038/nrm1786
- Elinson, R. P., Remo, B., & Brown, D. D. (1999). Novel structural elements identified during tail resorption in *Xenopus laevis* metamorphosis: lessons from tailed frogs. *Dev Biol*, 215(2), 243-252. doi: 10.1006/dbio.1999.9481
- Eroglu, C., & Barres, B. A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*, 468(7321), 223-231. doi: 10.1038/nature09612

- Faelber, K., Posor, Y., Gao, S., Held, M., Roske, Y., Schulze, D., . . . Daumke, O. (2011). Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature*, 477(7366), 556-560. doi: 10.1038/nature10369
- Feldmeyer, D., & Radnikow, G. (2009). Developmental alterations in the functional properties of excitatory neocortical synapses. *J Physiol*, 587(Pt 9), 1889-1896. doi: 10.1113/jphysiol.2009.169458
- Feng, Z., & Ko, C. P. (2008). Schwann cells promote synaptogenesis at the neuromuscular junction via transforming growth factor-beta1. *J Neurosci*, 28(39), 9599-9609. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2589-08.2008
- Ferguson, S. M., Ferguson, S., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., . . . De Camilli, P. (2009). Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell*, 17(6), 811-822. doi: 10.1016/j.devcel.2009.11.005
- Fernández-Alfonso, T., & Ryan, T. A. (2004). The kinetics of synaptic vesicle pool depletion at CNS synaptic terminals. *Neuron*, 41(6), 943-953.
- Fernandez-Alfonso, T., & Ryan, T. A. (2008). A heterogeneous "resting" pool of synaptic vesicles that is dynamically interchanged across boutons in mammalian CNS synapses. *Brain Cell Biol*, 36(1-4), 87-100. doi: 10.1007/s11068-008-9030-y
- Fesce, R., Grohovaz, F., Valtorta, F., & Meldolesi, J. (1994). Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? *Trends Cell Biol*, 4(1), 1-4.
- Festoff, B. W., Suo, Z., & Citron, B. A. (2001). Plasticity and stabilization of neuromuscular and CNS synapses: interactions between thrombin protease signaling pathways and tissue transglutaminase. *Int Rev Cytol*, 211, 153-177.
- Ford, M. G., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, 419(6905), 361-366. doi: 10.1038/nature01020
- Ford, M. G., Pearse, B. M., Higgins, M. K., Vallis, Y., Owen, D. J., Gibson, A., . . . McMahon, H. T. (2001). Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science*, 291(5506), 1051-1055. doi: 10.1126/science.291.5506.1051
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T., & Walz, T. (2004). Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature*, 432(7017), 573-579. doi: 10.1038/nature03079
- Freeman, M. R. (2005). Glial control of synaptogenesis. *Cell*, 120(3), 292-293. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.021
- Funderburk, S. F., Marcellino, B. K., & Yue, Z. (2010). Cell "self-eating" (autophagy) mechanism in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*, 77(1), 59-68. doi: 10.1002/msj.20161
- Funk, S. E., & Sage, E. H. (1993). Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol*, 154(1), 53-63. doi: 10.1002/jcp.1041540108
- Furshpan, E. J., Landis, S. C., Matsumoto, S. G., & Potter, D. D. (1986). Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. I. Secretion of norepinephrine and acetylcholine. *J Neurosci*, 6(4), 1061-1079.
- Gaffield, M. A., Rizzoli, S. O., & Betz, W. J. (2006). Mobility of synaptic vesicles in different pools in resting and stimulated frog motor nerve terminals. *Neuron*, 51(3), 317-325. doi: 10.1016/j.neuron.2006.06.031
- Gaffield, M. A., Tabares, L., & Betz, W. J. (2009). Preferred sites of exocytosis and endocytosis colocalize during high- but not lower-frequency stimulation in mouse motor nerve terminals. *J Neurosci*, 29(48), 15308-15316. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4646-09.2009
- Gaidarov, I., & Keen, J. H. (1999). Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol*, 146(4), 755-764.

- Gallop, J. L., & McMahon, H. T. (2005). BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochem Soc Symp*(72), 223-231.
- Gan, W. B., Kwon, E., Feng, G., Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (2003). Synaptic dynamism measured over minutes to months: age-dependent decline in an autonomic ganglion. *Nat Neurosci*, 6(9), 956-960. doi: 10.1038/nn1115
- Gandhi, S. P., & Stevens, C. F. (2003). Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature*, 423(6940), 607-613. doi: 10.1038/nature01677
- Garner, C. C., Waites, C. L., & Ziv, N. E. (2006). Synapse development: still looking for the forest, still lost in the trees. *Cell Tissue Res*, 326(2), 249-262. doi: 10.1007/s00441-006-0278-1
- Gillespie, J. I. (1979). The effect of repetitive stimulation on the passive electrical properties of the presynaptic terminal of the squid giant synapse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 206(1164), 293-306.
- Giudici, C., Raynal, N., Wiedemann, H., Cabral, W. A., Marini, J. C., Timpl, R., . . . Tenni, R. (2008). Mapping of SPARC/BM-40/osteonectin-binding sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem*, 283(28), 19551-19560. doi: 10.1074/jbc.M710001200
- Goritz, C., Mauch, D. H., & Priege, F. W. (2005). Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol Cell Neurosci*, 29(2), 190-201. doi: 10.1016/j.mcn.2005.02.006
- Goud, B., Huet, C., & Louvard, D. (1985). Assembled and unassembled pools of clathrin: a quantitative study using an enzyme immunoassay. *J Cell Biol*, 100(2), 521-527.
- Granseth, B., & Lagnado, L. (2008). The role of endocytosis in regulating the strength of hippocampal synapses. *J Physiol*, 586(Pt 24), 5969-5982. doi: 10.1113/jphysiol.2008.159715
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S. J., & Lagnado, L. (2006). Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron*, 51(6), 773-786. doi: 10.1016/j.neuron.2006.08.029
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S. J., & Lagnado, L. (2009). Comment on "The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles". *Science*, 325(5947), 1499; author reply 1499. doi: 10.1126/science.1175790
- Haucke, V., & De Camilli, P. (1999). AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science*, 285(5431), 1268-1271.
- Haucke, V., Neher, E., & Sigrist, S. J. (2011). Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Neurosci*, 12(3), 127-138. doi: 10.1038/nrn2948
- Heath, J. W., Glenfield, P. J., & Rostas, J. A. (1992). Structural maturation of synapses in the rat superior cervical ganglion continues beyond four weeks of age. *Neurosci Lett*, 142(1), 17-21.
- Heerssen, H., Fetter, R. D., & Davis, G. W. (2008). Clathrin dependence of synaptic-vesicle formation at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Curr Biol*, 18(6), 401-409. doi: 10.1016/j.cub.2008.02.055
- Henne, W. M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., & McMahon, H. T. (2010). FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science*, 328(5983), 1281-1284. doi: 10.1126/science.1188462
- Hermann, J., Grothe, B., & Klug, A. (2009). Modeling short-term synaptic plasticity at the calyx of Held using in vivo-like stimulation patterns. *J Neurophysiol*, 101(1), 20-30. doi: 10.1152/jn.90243.2008
- Hermann, J., Pecka, M., von Gersdorff, H., Grothe, B., & Klug, A. (2007). Synaptic transmission at the calyx of Held under in vivo like activity levels. *J Neurophysiol*, 98(2), 807-820. doi: 10.1152/jn.00355.2007
- Heuser, J. E., & Reese, T. S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 57(2), 315-344.

- Hohenester, E., Maurer, P., & Timpl, R. (1997). Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *EMBO J*, 16(13), 3778-3786. doi: 10.1093/emboj/16.13.3778
- Holt, M., Cooke, A., Neef, A., & Lagnado, L. (2004). High mobility of vesicles supports continuous exocytosis at a ribbon synapse. *Curr Biol*, 14(3), 173-183. doi: 10.1016/j.cub.2003.12.053
- Holt, M., Cooke, A., Wu, M. M., & Lagnado, L. (2003). Bulk membrane retrieval in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *J Neurosci*, 23(4), 1329-1339.
- Hoopmann, P., Punge, A., Barysch, S. V., Westphal, V., Bückers, J., Opazo, F., . . . Rizzoli, S. O. (2010). Endosomal sorting of readily releasable synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(44), 19055-19060. doi: 10.1073/pnas.1007037107
- Hosoi, N., Holt, M., & Sakaba, T. (2009). Calcium dependence of exo- and endocytotic coupling at a glutamatergic synapse. *Neuron*, 63(2), 216-229. doi: 10.1016/j.neuron.2009.06.010
- Hua, Y., Sinha, R., Thiel, C. S., Schmidt, R., Hüve, J., Martens, H., . . . Klingauf, J. (2011). A readily retrievable pool of synaptic vesicles. *Nat Neurosci*, 14(7), 833-839. doi: 10.1038/nn.2838
- Hua, Y., Woehler, A., Kahms, M., Haucke, V., Neher, E., & Klingauf, J. (2013). Blocking endocytosis enhances short-term synaptic depression under conditions of normal availability of vesicles. *Neuron*, 80(2), 343-349. doi: 10.1016/j.neuron.2013.08.010
- Huang, W. X., Yu, Q., & Cohen, M. I. (2000). Fast (3 Hz and 10 Hz) and slow (respiratory) rhythms in cervical sympathetic nerve and unit discharges of the cat. *J Physiol*, 523 Pt 2, 459-477.
- Huberman, A. D. (2007). Mechanisms of eye-specific visual circuit development. *Curr Opin Neurobiol*, 17(1), 73-80. doi: 10.1016/j.conb.2007.01.005
- Hughes, E. G., Elmariah, S. B., & Balice-Gordon, R. J. (2010). Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Mol Cell Neurosci*, 43(1), 136-145. doi: 10.1016/j.mcn.2009.10.004
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J*, 30(17), 3481-3500. doi: 10.1038/emboj.2011.286
- Ikeda, K., & Bekkers, J. M. (2009). Counting the number of releasable synaptic vesicles in a presynaptic terminal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(8), 2945-2950. doi: 10.1073/pnas.0811017106
- Itoh, T., & De Camilli, P. (2006). BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta*, 1761(8), 897-912. doi: 10.1016/j.bbali.2006.06.015
- Job, C., & Lagnado, L. (1998). Calcium and protein kinase C regulate the actin cytoskeleton in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *J Cell Biol*, 143(6), 1661-1672.
- Jones, E. V., Bernardinelli, Y., Tse, Y. C., Chierzi, S., Wong, T. P., & Murai, K. K. (2011). Astrocytes control glutamate receptor levels at developing synapses through SPARC-beta-integrin interactions. *J Neurosci*, 31(11), 4154-4165. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4757-10.2011
- Jordan, R., Lemke, E. A., & Klingauf, J. (2005). Visualization of synaptic vesicle movement in intact synaptic boutons using fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys J*, 89(3), 2091-2102. doi: 10.1529/biophysj.105.061663
- Jung, N., & Haucke, V. (2007). Clathrin-mediated endocytosis at synapses. *Traffic*, 8(9), 1129-1136. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00595.x
- Kamin, D., Lauterbach, M. A., Westphal, V., Keller, J., Schönle, A., Hell, S. W., & Rizzoli, S. O. (2010). High- and low-mobility stages in the synaptic vesicle cycle. *Biophys J*, 99(2), 675-684. doi: 10.1016/j.bpj.2010.04.054
- Kanaseki, T., & Kadota, K. (1969). The "vesicle in a basket". A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *J Cell Biol*, 42(1), 202-220.

- Kano, M., & Hashimoto, K. (2009). Synapse elimination in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 19(2), 154-161. doi: 10.1016/j.conb.2009.05.002
- Kasprowicz, J., Kuenen, S., Miskiewicz, K., Habets, R. L., Smitz, L., & Verstreken, P. (2008). Inactivation of clathrin heavy chain inhibits synaptic recycling but allows bulk membrane uptake. *J Cell Biol*, 182(5), 1007-1016. doi: 10.1083/jcb.200804162
- KATZ, B., & MILEDI, R. (1965). THE EFFECT OF CALCIUM ON ACETYLCHOLINE RELEASE FROM MOTOR NERVE TERMINALS. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 161, 496-503.
- Kaur, S., Fielding, A. B., Gassner, G., Carter, N. J., & Royle, S. J. (2014). An unmet actin requirement explains the mitotic inhibition of clathrin-mediated endocytosis. *Elife*, 3, e00829.
- Kim, S. H., & Ryan, T. A. (2009). Synaptic vesicle recycling at CNS synapses without AP-2. *J Neurosci*, 29(12), 3865-3874. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5639-08.2009
- Klingauf, J., Kavalali, E. T., & Tsien, R. W. (1998). Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature*, 394(6693), 581-585. doi: 10.1038/29079
- Klyachko, V. A., & Jackson, M. B. (2002). Capacitance steps and fusion pores of small and large-dense-core vesicles in nerve terminals. *Nature*, 418(6893), 89-92. doi: 10.1038/nature00852
- Koenig, J. H., & Ikeda, K. (1989). Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J Neurosci*, 9(11), 3844-3860.
- Koenig, J. H., & Ikeda, K. (1996). Synaptic vesicles have two distinct recycling pathways. *J Cell Biol*, 135(3), 797-808.
- Kononenko, N. L., & Haucke, V. (2015). Molecular Mechanisms of Presynaptic Membrane Retrieval and Synaptic Vesicle Reformation. *Neuron*, 85(3), 484-496. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.016
- Kononenko, N. L., Pechstein, A., & Haucke, V. (2013). The tortoise and the hare revisited. *Elife*, 2, e01233. doi: 10.7554/eLife.01233
- Kononenko, N. L., Puchkov, D., Classen, G. A., Walter, A. M., Pechstein, A., Sawade, L., . . . Haucke, V. (2014). Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron*, 82(5), 981-988. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.007
- Korn, M. J., Koppel, S. J., Li, L. H., Mehta, D., Mehta, S. B., Seidl, A. H., & Cramer, K. S. (2012). Astrocyte-secreted factors modulate the developmental distribution of inhibitory synapses in nucleus laminaris of the avian auditory brainstem. *J Comp Neurol*, 520(6), 1262-1277. doi: 10.1002/cne.22786
- Krucker, T., Siggins, G. R., & Halpain, S. (2000). Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12), 6856-6861. doi: 10.1073/pnas.100139797
- Kucukdereli, H., Allen, N. J., Lee, A. T., Feng, A., Ozlu, M. I., Conatser, L. M., . . . Eroglu, C. (2011). Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(32), E440-449. doi: 10.1073/pnas.1104977108
- Kupprion, C., Motamed, K., & Sage, E. H. (1998). SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 273(45), 29635-29640.
- Kuromi, H., & Kidokoro, Y. (2000). Tetanic stimulation recruits vesicles from reserve pool via a cAMP-mediated process in *Drosophila* synapses. *Neuron*, 27(1), 133-143.
- Lane, T. F., Iruela-Arispe, M. L., Johnson, R. S., & Sage, E. H. (1994). SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis. *J Cell Biol*, 125(4), 929-943.
- Lazarevic, V., Schöne, C., Heine, M., Gundelfinger, E. D., & Fejtova, A. (2011). Extensive remodeling of the presynaptic cytomatrix upon homeostatic adaptation to network activity silencing. *J Neurosci*, 31(28), 10189-10200. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2088-11.2011

- Lemke, E. A., & Klingauf, J. (2005). Single synaptic vesicle tracking in individual hippocampal boutons at rest and during synaptic activity. *J Neurosci*, 25(47), 11034-11044. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2971-05.2005
- Li, Z., Burrone, J., Tyler, W. J., Hartman, K. N., Albeanu, D. F., & Murthy, V. N. (2005). Synaptic vesicle recycling studied in transgenic mice expressing synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(17), 6131-6136. doi: 10.1073/pnas.0501145102
- Li, Z., & Murthy, V. N. (2001). Visualizing postendocytic traffic of synaptic vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, 31(4), 593-605.
- Lichtman, J. W., & Purves, D. (1980). The elimination of redundant preganglionic innervation to hamster sympathetic ganglion cells in early post-natal life. *J Physiol*, 301, 213-228.
- Liu, X., Ying, G., Wang, W., Dong, J., Wang, Y., Ni, Z., & Zhou, C. (2005). Entorhinal deafferentation induces upregulation of SPARC in the mouse hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 141(1), 58-65. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.08.003
- Llobet, A., Beaumont, V., & Lagnado, L. (2003). Real-time measurement of exocytosis and endocytosis using interference of light. *Neuron*, 40(6), 1075-1086.
- Llobet, A., Cooke, A., & Lagnado, L. (2003). Exocytosis at the ribbon synapse of retinal bipolar cells studied in patches of presynaptic membrane. *J Neurosci*, 23(7), 2706-2714.
- Llobet, A., Wu, M., & Lagnado, L. (2008). The mouth of a dense-core vesicle opens and closes in a concerted action regulated by calcium and amphiphysin. *J Cell Biol*, 182(5), 1017-1028. doi: 10.1083/jcb.200807034
- Lou, X., Scheuss, V., & Schneggenburger, R. (2005). Allosteric modulation of the presynaptic Ca<sup>2+</sup> sensor for vesicle fusion. *Nature*, 435(7041), 497-501. doi: 10.1038/nature03568
- Lu, T., & Trussell, L. O. (2007). Development and elimination of endbulb synapses in the chick cochlear nucleus. *J Neurosci*, 27(4), 808-817. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4871-06.2007
- LUNDBERG, A., & QUILISCH, H. (1953). On the effect of calcium on presynaptic potentiation and depression at the neuro-muscular junction. *Acta Physiol Scand Suppl*, 111, 121-129.
- Maeno-Hikichi, Y., Polo-Parada, L., Kastanenka, K. V., & Landmesser, L. T. (2011). Frequency-dependent modes of synaptic vesicle endocytosis and exocytosis at adult mouse neuromuscular junctions. *J Neurosci*, 31(3), 1093-1105. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2800-10.2011
- Mariani, J. (1983). Elimination of synapses during the development of the central nervous system. *Prog Brain Res*, 58, 383-392. doi: 10.1016/S0079-6123(08)60041-2
- Massol, R. H., Boll, W., Griffin, A. M., & Kirchhausen, T. (2006). A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(27), 10265-10270. doi: 10.1073/pnas.0603369103
- McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(8), 517-533. doi: 10.1038/nrm3151
- Mendis, D. B., & Brown, I. R. (1994). Expression of the gene encoding the extracellular matrix glycoprotein SPARC in the developing and adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 24(1-4), 11-19.
- Mendis, D. B., Ivy, G. O., & Brown, I. R. (1998). SPARC/osteonectin mRNA is induced in blood vessels following injury to the adult rat cerebral cortex. *Neurochem Res*, 23(8), 1117-1123.
- Mendis, D. B., Malaval, L., & Brown, I. R. (1995). SPARC, an extracellular matrix glycoprotein containing the follistatin module, is expressed by astrocytes in synaptic enriched regions of the adult brain. *Brain Res*, 676(1), 69-79.

- Mendis, D. B., Shahin, S., Gurd, J. W., & Brown, I. R. (1994). Developmental expression in the rat cerebellum of SC1, a putative brain extracellular matrix glycoprotein related to SPARC. *Brain Res*, 633(1-2), 197-205.
- Mennerick, S., & Matthews, G. (1996). Ultrafast exocytosis elicited by calcium current in synaptic terminals of retinal bipolar neurons. *Neuron*, 17(6), 1241-1249.
- Miesenböck, G., De Angelis, D. A., & Rothman, J. E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 394(6689), 192-195. doi: 10.1038/28190
- Millar, A. G., Bradacs, H., Charlton, M. P., & Atwood, H. L. (2002). Inverse relationship between release probability and readily releasable vesicles in depressing and facilitating synapses. *J Neurosci*, 22(22), 9661-9667.
- Miller, T. M., & Heuser, J. E. (1984). Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 98(2), 685-698.
- Morales, M., Colicos, M. A., & Goda, Y. (2000). Actin-dependent regulation of neurotransmitter release at central synapses. *Neuron*, 27(3), 539-550.
- Moskowitz, H. S., Yokoyama, C. T., & Ryan, T. A. (2005). Highly cooperative control of endocytosis by clathrin. *Mol Biol Cell*, 16(4), 1769-1776. doi: 10.1091/mbc.E04-08-0739
- Mozhayeva, M. G., Sara, Y., Liu, X., & Kavalali, E. T. (2002). Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *J Neurosci*, 22(3), 654-665.
- Murphy-Ullrich, J. E. (2001). The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest*, 107(7), 785-790. doi: 10.1172/JCI12609
- Murphy-Ullrich, J. E., & Sage, E. H. (2014). Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol*, 37, 1-14. doi: 10.1016/j.matbio.2014.07.005
- Naves, L. A., & Van der Kloot, W. (2001). Repetitive nerve stimulation decreases the acetylcholine content of quanta at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 532(Pt 3), 637-647.
- Neher, E., & Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(21), 6712-6716.
- Neves, G., & Lagnado, L. (1999). The kinetics of exocytosis and endocytosis in the synaptic terminal of goldfish retinal bipolar cells. *J Physiol*, 515 ( Pt 1), 181-202.
- Nie, J., & Sage, E. H. (2009). SPARC inhibits adipogenesis by its enhancement of beta-catenin signaling. *J Biol Chem*, 284(2), 1279-1290. doi: 10.1074/jbc.M808285200
- Nikoletopoulou, V., Papandreou, M., & Tavernarakis, N. (2014). Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death Differ*. doi: 10.1038/cdd.2014.204
- Nägler, K., Mauch, D. H., & Pfrieger, F. W. (2001). Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. *J Physiol*, 533(Pt 3), 665-679.
- O'Brien, R. A., Ostberg, A. J., & Vrbová, G. (1978). Observations on the elimination of polyneuronal innervation in developing mammalian skeletal muscle. *J Physiol*, 282, 571-582.
- Opazo, F., Punge, A., Bückers, J., Hoopmann, P., Kastrop, L., Hell, S. W., & Rizzoli, S. O. (2010). Limited intermixing of synaptic vesicle components upon vesicle recycling. *Traffic*, 11(6), 800-812. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01058.x
- Opazo, F., & Rizzoli, S. O. (2010). Studying synaptic vesicle pools using photoconversion of styryl dyes. *J Vis Exp*(36). doi: 10.3791/1790
- Park, H., Li, Y., & Tsien, R. W. (2012). Influence of synaptic vesicle position on release probability and exocytotic fusion mode. *Science*, 335(6074), 1362-1366. doi: 10.1126/science.1216937

- Peng, H. B., Yang, J. F., Dai, Z., Lee, C. W., Hung, H. W., Feng, Z. H., & Ko, C. P. (2003). Differential effects of neurotrophins and schwann cell-derived signals on neuronal survival/growth and synaptogenesis. *J Neurosci*, 23(12), 5050-5060.
- Perea, G., & Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, 317(5841), 1083-1086. doi: 10.1126/science.1144640
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*, 32(8), 421-431. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.001
- Perea, G., Sur, M., & Araque, A. (2014). Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Front Cell Neurosci*, 8, 378. doi: 10.3389/fncel.2014.00378
- Perea, G., Yang, A., Boyden, E. S., & Sur, M. (2014). Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nat Commun*, 5, 3262. doi: 10.1038/ncomms4262
- Perez-Gonzalez, A. P., Albrecht, D., Blasi, J., & Llobet, A. (2008). Schwann cells modulate short-term plasticity of cholinergic autaptic synapses. *J Physiol*, 586(Pt 19), 4675-4691. doi: 10.1113/jphysiol.2008.160044
- Pieribone, V. A., Shupliakov, O., Brodin, L., Hilfiker-Rothenfluh, S., Czernik, A. J., & Greengard, P. (1995). Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature*, 375(6531), 493-497. doi: 10.1038/375493a0
- Poudel, K. R., & Bai, J. (2014). Synaptic vesicle morphology: a case of protein sorting? *Curr Opin Cell Biol*, 26, 28-33. doi: 10.1016/j.ceb.2013.09.001
- Pravettoni, E., Bacci, A., Coco, S., Forbicini, P., Matteoli, M., & Verderio, C. (2000). Different localizations and functions of L-type and N-type calcium channels during development of hippocampal neurons. *Dev Biol*, 227(2), 581-594. doi: 10.1006/dbio.2000.9872
- Purves, D., & Lichtman, J. W. (1980). Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science*, 210(4466), 153-157.
- Pyka, M., Busse, C., Seidenbecher, C., Gundelfinger, E. D., & Faissner, A. (2011). Astrocytes are crucial for survival and maturation of embryonic hippocampal neurons in a neuron-glia cell-insert coculture assay. *Synapse*, 65(1), 41-53. doi: 10.1002/syn.20816
- Pyle, J. L., Kavalali, E. T., Piedras-Rentería, E. S., & Tsien, R. W. (2000). Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, 28(1), 221-231.
- Quattrocchi, C. C., Huang, C., Niu, S., Sheldon, M., Benhayon, D., Cartwright, J., . . . D'Arcangelo, G. (2003). Reelin promotes peripheral synapse elimination and maturation. *Science*, 301(5633), 649-653. doi: 10.1126/science.1082690
- Quattrocchi, C. C., Wannenes, F., Persico, A. M., Ciafré, S. A., D'Arcangelo, G., Farace, M. G., & Keller, F. (2002). Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 277(1), 303-309. doi: 10.1074/jbc.M106996200
- Rahamimoff, R., & Dodge, F. A. (1969). Regulation of transmitter release at the neuromuscular synapse: the cooperative hypothesis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 27(2), 219.
- Rao, Y., Ma, Q., Vahedi-Faridi, A., Sundborger, A., Pechstein, A., Puchkov, D., . . . Haucke, V. (2010). Molecular basis for SH3 domain regulation of F-BAR-mediated membrane deformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(18), 8213-8218. doi: 10.1073/pnas.1003478107
- Rees, R. P., Bunge, M. B., & Bunge, R. P. (1976). Morphological changes in the neuritic growth cone and target neuron during synaptic junction development in culture. *J Cell Biol*, 68(2), 240-263.
- Renden, R., & von Gersdorff, H. (2007). Synaptic vesicle endocytosis at a CNS nerve terminal: faster kinetics at physiological temperatures and increased endocytotic



- capacity during maturation. *J Neurophysiol*, 98(6), 3349-3359. doi: 10.1152/jn.00898.2007
- Richards, D. A., Guatimosim, C., & Betz, W. J. (2000). Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron*, 27(3), 551-559.
- Richards, D. A., Guatimosim, C., Rizzoli, S. O., & Betz, W. J. (2003). Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron*, 39(3), 529-541.
- Rizzoli, S. O., & Betz, W. J. (2004). The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science*, 303(5666), 2037-2039. doi: 10.1126/science.1094682
- Rizzoli, S. O., & Betz, W. J. (2005). Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*, 6(1), 57-69. doi: 10.1038/nrn1583
- Rohde, G., Wenzel, D., & Haucke, V. (2002). A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, 158(2), 209-214. doi: 10.1083/jcb.200203103
- Rosahl, T. W., Spillane, D., Missler, M., Herz, J., Selig, D. K., Wolff, J. R., . . . Südhof, T. C. (1995). Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature*, 375(6531), 488-493. doi: 10.1038/375488a0
- Rose, T., Schoenenberger, P., Jezek, K., & Oertner, T. G. (2013). Developmental refinement of vesicle cycling at Schaffer collateral synapses. *Neuron*, 77(6), 1109-1121. doi: 10.1016/j.neuron.2013.01.021
- Rosenmund, C., & Stevens, C. F. (1996). Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, 16(6), 1197-1207.
- Rossano, A. J., Chouhan, A. K., & Macleod, G. T. (2013). Genetically encoded pH-indicators reveal activity-dependent cytosolic acidification of *Drosophila* motor nerve termini in vivo. *J Physiol*, 591(Pt 7), 1691-1706. doi: 10.1113/jphysiol.2012.248377
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A., & De Camilli, P. (2006). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature*, 441(7092), 528-531. doi: 10.1038/nature04718
- Royle, S. J., N. A. Bright and L. Lagnado (2005). "Clathrin is required for the function of the mitotic spindle." *Nature* **434**(7037): 1152-1157.
- Royle, S. J., & Lagnado, L. (2010). Clathrin-mediated endocytosis at the synaptic terminal: bridging the gap between physiology and molecules. *Traffic*, 11(12), 1489-1497. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01104.x
- Ryan, T. A., Li, L., Chin, L. S., Greengard, P., & Smith, S. J. (1996). Synaptic vesicle recycling in synapsin I knock-out mice. *J Cell Biol*, 134(5), 1219-1227.
- Ryan, T. A., & Reuter, H. (2001). Measurements of vesicle recycling in central neurons. *News Physiol Sci*, 16, 10-14.
- Saftig, P., & Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(9), 623-635. doi: 10.1038/nrm2745
- Sage, E. H., Reed, M., Funk, S. E., Truong, T., Steadale, M., Puolakkainen, P., . . . Bassuk, J. A. (2003). Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis. *J Biol Chem*, 278(39), 37849-37857. doi: 10.1074/jbc.M302946200
- Saheki, Y., & De Camilli, P. (2012). Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9), a005645. doi: 10.1101/cshperspect.a005645
- Sankaranarayanan, S., Atluri, P. P., & Ryan, T. A. (2003). Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nat Neurosci*, 6(2), 127-135. doi: 10.1038/nn1002
- Sankaranarayanan, S., & Ryan, T. A. (2000). Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nat Cell Biol*, 2(4), 197-204. doi: 10.1038/35008615

- Sara, Y., Mozhayeva, M. G., Liu, X., & Kavalali, E. T. (2002). Fast vesicle recycling supports neurotransmission during sustained stimulation at hippocampal synapses. *J Neurosci*, 22(5), 1608-1617.
- Sasaki, T., Göhring, W., Mann, K., Maurer, P., Hohenester, E., Knäuper, V., . . . Timpl, R. (1997). Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J Biol Chem*, 272(14), 9237-9243.
- Sasaki, T., Hohenester, E., Göhring, W., & Timpl, R. (1998). Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *EMBO J*, 17(6), 1625-1634. doi: 10.1093/emboj/17.6.1625
- Sätzler, K., Söhl, L. F., Bollmann, J. H., Borst, J. G., Frotscher, M., Sakmann, B., & Lübke, J. H. (2002). Three-dimensional reconstruction of a calyx of Held and its postsynaptic principal neuron in the medial nucleus of the trapezoid body. *J Neurosci*, 22(24), 10567-10579.
- Schneggenburger, R., Meyer, A. C., & Neher, E. (1999). Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron*, 23(2), 399-409.
- Scholz, K. P., & Miller, R. J. (1995). Developmental changes in presynaptic calcium channels coupled to glutamate release in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci*, 15(6), 4612-4617.
- Shupliakov, O., Bloom, O., Gustafsson, J. S., Kjaerulff, O., Low, P., Tomilin, N., . . . Brodin, L. (2002). Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22), 14476-14481. doi: 10.1073/pnas.212381799
- Shupliakov, O., & Brodin, L. (2010). Recent insights into the building and cycling of synaptic vesicles. *Exp Cell Res*, 316(8), 1344-1350. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.035
- Slepnev, V. I., & De Camilli, P. (2000). Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci*, 1(3), 161-172. doi: 10.1038/35044540
- Smillie, K. J., Pawson, J., Perkins, E. M., Jackson, M., & Cousin, M. A. (2013). Control of synaptic vesicle endocytosis by an extracellular signalling molecule. *Nat Commun*, 4, 2394. doi: 10.1038/ncomms3394
- Smith, I. W., Mikesch, M., Lee, Y., & Thompson, W. J. (2013). Terminal Schwann cells participate in the competition underlying neuromuscular synapse elimination. *J Neurosci*, 33(45), 17724-17736. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3339-13.2013
- Smith, S. M., Renden, R., & von Gersdorff, H. (2008). Synaptic vesicle endocytosis: fast and slow modes of membrane retrieval. *Trends Neurosci*, 31(11), 559-568. doi: 10.1016/j.tins.2008.08.005
- Son, J. H., Shim, J. H., Kim, K. H., Ha, J. Y., & Han, J. Y. (2012). Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*, 44(2), 89-98. doi: 10.3858/emmm.2012.44.2.031
- Song, J. W., Misgeld, T., Kang, H., Knecht, S., Lu, J., Cao, Y., . . . Lichtman, J. W. (2008). Lysosomal activity associated with developmental axon pruning. *J Neurosci*, 28(36), 8993-9001. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0720-08.2008
- Staras, K., Branco, T., Burden, J. J., Pozo, K., Darcy, K., Marra, V., . . . Goda, Y. (2010). A vesicle superpool spans multiple presynaptic terminals in hippocampal neurons. *Neuron*, 66(1), 37-44. doi: 10.1016/j.neuron.2010.03.020
- Stevens, C. F., & Tsujimoto, T. (1995). Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(3), 846-849.
- Stevens, C. F., & Williams, J. H. (2000). "Kiss and run" exocytosis at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(23), 12828-12833. doi: 10.1073/pnas.230438697

- Stevens, C. F., & Williams, J. H. (2007). Discharge of the readily releasable pool with action potentials at hippocampal synapses. *J Neurophysiol*, 98(6), 3221-3229. doi: 10.1152/jn.00857.2007
- Stimpson, H. E., Toret, C. P., Cheng, A. T., Pauly, B. S., & Drubin, D. G. (2009). Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 20(22), 4640-4651. doi: 10.1091/mbc.E09-05-0429
- Stowell, M. H., Marks, B., Wigge, P., & McMahon, H. T. (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol*, 1(1), 27-32. doi: 10.1038/8997
- Sun, J. Y., Wu, X. S., & Wu, L. G. (2002). Single and multiple vesicle fusion induce different rates of endocytosis at a central synapse. *Nature*, 417(6888), 555-559. doi: 10.1038/417555a
- Sundborger, A., Soderblom, C., Vorontsova, O., Evergren, E., Hinshaw, J. E., & Shupliakov, O. (2011). An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *J Cell Sci*, 124(Pt 1), 133-143. doi: 10.1242/jcs.072686
- Sweitzer, S. M., & Hinshaw, J. E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*, 93(6), 1021-1029.
- Südhof, T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, 375(6533), 645-653. doi: 10.1038/375645a0
- Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80(3), 675-690. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.022
- Südhof, T. C., & Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(12). doi: 10.1101/cshperspect.a005637
- Tai, I. T., & Tang, M. J. (2008). SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist Updat*, 11(6), 231-246. doi: 10.1016/j.drug.2008.08.005
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., . . . Jahn, R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127(4), 831-846. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.030
- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L., & De Camilli, P. (1996). The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol*, 133(6), 1237-1250.
- Taschenberger, H., & von Gersdorff, H. (2000). Fine-tuning an auditory synapse for speed and fidelity: developmental changes in presynaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. *J Neurosci*, 20(24), 9162-9173.
- Teng, H., Lin, M. Y., & Wilkinson, R. S. (2007). Macroendocytosis and endosome processing in snake motor boutons. *J Physiol*, 582(Pt 1), 243-262. doi: 10.1113/jphysiol.2007.130989
- Ullian, E. M., Christopherson, K. S., & Barres, B. A. (2004). Role for glia in synaptogenesis. *Glia*, 47(3), 209-216. doi: 10.1002/glia.20082
- Ullian, E. M., Harris, B. T., Wu, A., Chan, J. R., & Barres, B. A. (2004). Schwann cells and astrocytes induce synapse formation by spinal motor neurons in culture. *Mol Cell Neurosci*, 25(2), 241-251. doi: 10.1016/j.mcn.2003.10.011
- Ułamek-Kozioł, M., Furmaga-Jabłońska, W., Januszewski, S., Brzozowska, J., Ściślewska, M., Jabłoński, M., & Pluta, R. (2013). Neuronal autophagy: self-eating or self-cannibalism in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 38(9), 1769-1773. doi: 10.1007/s11064-013-1082-4
- Ulrich, D., & Lüscher, H. R. (1993). Miniature excitatory synaptic currents corrected for dendritic cable properties reveal quantal size and variance. *J Neurophysiol*, 69(5), 1769-1773.

- Vallis, Y., Wigge, P., Marks, B., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (1999). Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol*, 9(5), 257-260.
- Vincent, A. J., Lau, P. W., & Roskams, A. J. (2008). SPARC is expressed by macroglia and microglia in the developing and mature nervous system. *Dev Dyn*, 237(5), 1449-1462. doi: 10.1002/dvdy.21495
- von Gersdorff, H., & Matthews, G. (1994). Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature*, 367(6465), 735-739. doi: 10.1038/367735a0
- von Gersdorff, H., & Matthews, G. (1997). Depletion and replenishment of vesicle pools at a ribbon-type synaptic terminal. *J Neurosci*, 17(6), 1919-1927.
- von Gersdorff, H., Schneggenburger, R., Weis, S., & Neher, E. (1997). Presynaptic depression at a calyx synapse: the small contribution of metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci*, 17(21), 8137-8146.
- von Kleist, L., Stahlschmidt, W., Bulut, H., Gromova, K., Puchkov, D., Robertson, M. J., . . . Haucke, V. (2011). Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell*, 146(3), 471-484. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.025
- Walsh, M. K., & Lichtman, J. W. (2003). In vivo time-lapse imaging of synaptic takeover associated with naturally occurring synapse elimination. *Neuron*, 37(1), 67-73.
- Wang, L. Y., Gan, L., Forsythe, I. D., & Kaczmarek, L. K. (1998). Contribution of the Kv3.1 potassium channel to high-frequency firing in mouse auditory neurones. *J Physiol*, 509 (Pt 1), 183-194.
- Wasling, P., Hanse, E., & Gustafsson, B. (2004). Developmental changes in release properties of the CA3-CA1 glutamate synapse in rat hippocampus. *J Neurophysiol*, 92(5), 2714-2724. doi: 10.1152/jn.00464.2004
- Watanabe, S., Liu, Q., Davis, M. W., Hollopeter, G., Thomas, N., Jorgensen, N. B., & Jorgensen, E. M. (2013). Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *Elife*, 2, e00723. doi: 10.7554/eLife.00723
- Watanabe, S., Rost, B. R., Camacho-Pérez, M., Davis, M. W., Söhl-Kielczynski, B., Rosenmund, C., & Jorgensen, E. M. (2013). Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*, 504(7479), 242-247. doi: 10.1038/nature12809
- Watanabe, S., Trimbuch, T., Camacho-Pérez, M., Rost, B. R., Brokowski, B., Söhl-Kielczynski, B., . . . Jorgensen, E. M. (2014). Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature*. doi: 10.1038/nature13846
- Wiegert, J. S., & Oertner, T. G. (2013). Long-term depression triggers the selective elimination of weakly integrated synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(47), E4510-4519. doi: 10.1073/pnas.1315926110
- Wienisch, M., & Klingauf, J. (2006). Vesicular proteins exocytosed and subsequently retrieved by compensatory endocytosis are nonidentical. *Nat Neurosci*, 9(8), 1019-1027. doi: 10.1038/nn1739
- Wigge, P., Köhler, K., Vallis, Y., Doyle, C. A., Owen, D., Hunt, S. P., & McMahon, H. T. (1997). Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*, 8(10), 2003-2015.
- Wilhelm, B. G., Mandad, S., Truckenbrodt, S., Kröhnert, K., Schäfer, C., Rammner, B., . . . Rizzoli, S. O. (2014). Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science*, 344(6187), 1023-1028. doi: 10.1126/science.1252884
- Wittenmayer, N., Körber, C., Liu, H., Kremer, T., Varoqueaux, F., Chapman, E. R., . . . Dresbach, T. (2009). Postsynaptic Neuroligin1 regulates presynaptic maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(32), 13564-13569. doi: 10.1073/pnas.0905819106

- Wu, L. G., & Betz, W. J. (1996). Nerve activity but not intracellular calcium determines the time course of endocytosis at the frog neuromuscular junction. *Neuron*, 17(4), 769-779.
- Wu, L. G., & Betz, W. J. (1998). Kinetics of synaptic depression and vesicle recycling after tetanic stimulation of frog motor nerve terminals. *Biophys J*, 74(6), 3003-3009. doi: 10.1016/S0006-3495(98)78007-5
- Wu, Y., O'Toole, E. T., Girard, M., Ritter, B., Messa, M., Liu, X., . . . De Camilli, P. (2014). A dynamin 1-, dynamin 3- and clathrin-independent pathway of synaptic vesicle recycling mediated by bulk endocytosis. *Elife*, 3, e01621. doi: 10.7554/eLife.01621
- Wu, W., Xu, J., Wu, X. S., & Wu, L. G. (2005). Activity-dependent acceleration of endocytosis at a central synapse. *J Neurosci*, 25(50), 11676-11683. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2972-05.2005
- Xing, Y., Böcking, T., Wolf, M., Grigorieff, N., Kirchhausen, T., & Harrison, S. C. (2010). Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *EMBO J*, 29(3), 655-665. doi: 10.1038/emboj.2009.383
- Xu, J., Xiao, N., & Xia, J. (2010). Thrombospondin 1 accelerates synaptogenesis in hippocampal neurons through neuroligin 1. *Nat Neurosci*, 13(1), 22-24. doi: 10.1038/nn.2459
- Xu-Friedman, M. A., Harris, K. M., & Regehr, W. G. (2001). Three-dimensional comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*, 21(17), 6666-6672.
- Xu-Friedman, M. A., & Regehr, W. G. (2003). Ultrastructural contributions to desensitization at cerebellar mossy fiber to granule cell synapses. *J Neurosci*, 23(6), 2182-2192.
- Yan, Q., Clark, J. I., & Sage, E. H. (2000). Expression and characterization of SPARC in human lens and in the aqueous and vitreous humors. *Exp Eye Res*, 71(1), 81-90. doi: 10.1006/exer.2000.0853
- Yan, Q., Clark, J. I., Wight, T. N., & Sage, E. H. (2002). Alterations in the lens capsule contribute to cataractogenesis in SPARC-null mice. *J Cell Sci*, 115(Pt 13), 2747-2756.
- Yan, Q., Sage, E. H., & Hendrickson, A. E. (1998). SPARC is expressed by ganglion cells and astrocytes in bovine retina. *J Histochem Cytochem*, 46(1), 3-10.
- Yarmola, E. G., Somasundaram, T., Boring, T. A., Spector, I., & Bubba, M. R. (2000). Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J Biol Chem*, 275(36), 28120-28127. doi: 10.1074/jbc.M004253200
- Zenisek, D., Steyer, J. A., Feldman, M. E., & Almers, W. (2002). A membrane marker leaves synaptic vesicles in milliseconds after exocytosis in retinal bipolar cells. *Neuron*, 35(6), 1085-1097.
- Zhang, W., & Benson, D. L. (2001). Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J Neurosci*, 21(14), 5169-5181.
- Zhang, W., & Benson, D. L. (2002). Developmentally regulated changes in cellular compartmentation and synaptic distribution of actin in hippocampal neurons. *J Neurosci Res*, 69(4), 427-436. doi: 10.1002/jnr.10313
- Zhu, Y., Xu, J., & Heinemann, S. F. (2009). Two pathways of synaptic vesicle retrieval revealed by single-vesicle imaging. *Neuron*, 61(3), 397-411. doi: 10.1016/j.neuron.2008.12.024
- Zucker, R. S., & Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 64, 355-405. doi: 10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547

# ANEXOS

*"Lo que tenemos que aprender, lo aprendemos  
haciéndolo"*

Aristóteles



## **ANEXO I. PREPARACIÓN DE COLÁGENO I A PARTIR DE COLAS DE RATA.**

La preparación de la solución de colágeno se realizó a partir tendones de colas de ratas de la especie Sprague-Dawley, de la misma colonia de ratas empleadas para realizar los microcultivos. El colágeno supone un sustrato permisivo para el crecimiento y establecimiento de neuronas del sistema nervioso periférico. El patrón de microgotas de colágeno generadas mediante un pulverizador permite que las neuronas puedan estar únicas sobre una de ellas, generando microcultivos de neuronas o neuronas autápticas.

### **I. Materiales y soluciones.**

- 5 litros agua bi-distilada, a 4º C
- Matraz de Erlenmeyer de 250 mL estéril
- 3-4 barras magnéticas de agitación estériles
- Vaso de precipitado de 5 litros estéril
- Vaso de precipitado de 600 mL estéril
- Probetas de 50, 100 y 1000 mL estériles
- Placas de *Petri* 100 mm estériles
- Hemóstatos y tijeras *Superfine Vannas* de punta recta 8 cm de largo

### **II. Procedimiento.**

Los materiales y soluciones fueron esterilizados previamente.

a) Se colectan colas de ratas adultas (250 g) y se esterilizan en etanol al 95% (v/v). Las colas de ratas se pueden usar frescas o pueden estar conservadas a -20º C, en cuyo caso, se dejan descongelar a temperatura ambiente y sumergidas en etanol.

b) Para la elaboración del colágeno, se emplearon entre 6 y 8 colas de ratas. La extracción de los tendones de las colas de ratas se realizó como se explica a continuación:

i) Con un hemóstato recto, se fija el extremo proximal de la cola. A continuación se coloca distalmente un segundo hemóstato, a una distancia de 1.0-1.5 cm aproximadamente del primer hemóstato. Una vez fijados los dos hemóstatos, se fractura la cola mediante



una torsión brusca y rápida; quedando el trozo de hueso proximal fracturado sujeto sólo por los tendones de la cola.

ii) El hueso fracturado se retira lentamente y se cortan las porciones de tendones que quedan colgando, colocándolos en una placa *Petri* que contiene agua bi-destilada estéril.

iii) Repetir el proceso hasta extraer los tendones completamente de cada cola.

c) Los tendones se lavan, separando las fibras de los restos de colas que puedan tener, transfiriéndolas a otra placa de *Petri* con agua bi-destilada estéril, con la ayuda de unas pinzas de acero inoxidable. Este proceso se repite dos veces para que los tendones queden perfectamente lavados de restos de grasa y sangre.

d) A continuación las fibras se ponen en una placa de *Petri* estéril inclinada para escurrir el exceso de agua.

e) Se pesan 4,5 g de tendones (semi-húmedos) y se transfieren al matraz de Erlenmeyer, conteniendo 150 mL de una solución de 3% (v/v) de ácido acético glacial. Los tendones se disuelven con una agitación lenta durante 24-36 horas a 4° C. A medida que el colágeno comienza a disolverse, la solución comienza a tornarse viscosa, deteniendo el movimiento de la barra de agitación; por lo que es importante comprobar el movimiento las primeras horas. También es importante que la agitación no sea ni rápida ni prolongada en el tiempo, para prevenir la disolución de otras proteínas.

f) Transcurridas las 24-36 horas, cuando la mayoría de los tendones se han disuelto, el medio se centrifuga a 13000 g, en una centrífuga Beckman modelo J2-HS (rotor JA 20) durante 90 minutos.

g) Bajo campana de flujo, se recoge el sobrenadante, descartando el precipitado, transfiriéndolo a una malla de diálisis (previamente hervida en una solución de EDTA 1 mM, pH 8, durante 10 minutos y posteriormente lavada un mínimo de 5 veces con agua bi-destilada estéril), dializando el colágeno sumergiendo la malla en 4 litros de una solución 0.1 x MEM (M0644, Sigma), pH 4.0 sin carbonato (ver Anexo II soluciones). La diálisis se realiza a 4° C durante 3 días, cambiando el medio cada 24 horas. La diálisis remueve el exceso de ácido, manteniendo un pH bajo para prevenir la gelificación del colágeno (el colágeno gelifica a pH alcalino).

h) Pasadas las 72 horas, el colágeno se recolecta, se le añade una solución de Penicilina/Estreptomicina a una concentración final de 1% (v/v) y se fracciona en alícuotas de 5 mL.

i) Normalmente se obtiene una solución final de colágeno muy concentrado y resulta viscosa para trabajar con ella en el momento de la pulverización de las microgotas; por lo que es necesario determinar una dilución de trabajo adecuada. Como el colágeno tiende a gelificar en presencia de pH alcalino, propiedad que aprovechamos para generar las gotas de colágenos al realizar los microcultivos. Las diluciones se realizan con un medio de RPMI 10x (1640 Medium, Sigma), con un pH entre 7,5-8,5. Cada vez que se elabora colágeno, se realizan ensayos para comprobar la proporción de colágeno y RPMI para pulverizar la placa. Por lo tanto se realizan las siguientes pruebas: 1 mL colágeno: 1 mL RPMI (1:1); 1 mL colágeno: 0,5 mL RPMI (2:1); 1 mL colágeno: 0,25 mL RPMI (4:1) y 1 mL colágeno: 0,1 mL RPMI (10:1). Para comprobar la dilución de trabajo correcta, a un atomizador se adicionan 2 mL de colágeno con el volumen de RPMI correspondientes para cada dilución, y se pulveriza sobre cubreobjetos previamente dispuestos en una placa de 12 pocillos, desde una distancia de entre 40 -50 cm; se espera aproximadamente 1 minuto y se adiciona a cada pocillo 1 mL de PBS a 37° C. Las gotas de colágeno resultantes se observan en un microscopio invertido de contraste de fase, durante varios días, a fin de determinar la dilución de trabajo en la que se obtiene el tamaño y la consistencia de gotas de colágeno apropiadas, y que dichas gotas no se despegan de la superficie de la placa. De no obtenerse gotas de colágeno con la calidad adecuada, se repite el paso anterior, ampliando el rango de diluciones entre las cuales se obtuvieron gotas de colágeno cercanas a la calidad requerida. Es importante no diluir demasiado el colágeno, porque la solución resultante no funciona adecuadamente.

j) Las alícuotas de colágeno se mantienen en nevera a 4° C. La solución de trabajo se va adecuando conforme a la calidad de las gotas obtenidas en los cultivos en función del tiempo transcurrido, utilizando cada vez una solución menos diluida de colágeno.

k) Finalmente, la solución de colágeno fresco se realiza cada 3-4 meses.



## **ANEXO II. SOLUCIONES.**

### **S1. Solución del medio de cultivo, MEM 0.1X (Minimum Essential Medium)**

- Esta solución se utiliza en la elaboración de colágeno tipo I a partir de cola de rata.

- Disolver el contenido del frasco de MEM (M0644, Sigma) en 100 mL de agua bi-destilada. La solución resultante es de 10X.

-Diluir 40 mL en 4 L de agua bi-destilada a 4°C, para 0.1X. Esta solución se utilizará para la diálisis del colágeno.

### **S2. Solución de Tris-EDTA 1 mM**

- Esta solución se utiliza para quelar los iones de calcio en la malla de diálisis del colágeno I extraído de la cola de rata.

- Se pesan 0.088 g de EDTA y se diluyen en 300 mL de agua bi-destilada, ajustando el pH a 8. El EDTA se diluye a pH básico, pero la dilución de esta sustancia acidifica la solución. Por lo tanto se ha de ir añadiendo NaOH 1 o 10 M para conseguir unas condiciones alcalinas y permitir la disolución del EDTA. Siempre en agitación.

### **S3. Solución de agarosa II-A 0.15% p/v**

- Esta solución se utiliza para el tratamiento de los cubre-objetos de las placas de cultivo, de las neuronas del ganglio cervical superior. La agarosa genera un medio no permisivo en el que las neuronas no sobrevivirán.

- Se pesan 0.06 g de agarosa II-A, y se diluyen en 40 mL de agua bi-destilada estéril.

- Para su disolución, se calienta en el microondas, evitando la ebullición, y a continuación se agita.

- Se añade a cada pocillo de la placa de cultivo, donde se encuentran los cubre-objetos, y se deja enfriar permitiendo sólo una película de agarosa por pocillo. El resto se retira.

### **S4. Agua tamponada pH 7.3**

- Esta solución se utiliza para la preparación de la mezcla de transfección de células HEK 293T, para la producción de lentivirus de alto título.

- Se prepara una solución de HEPES 2.5 mM en 50 mL de agua bi-destilada y se ajusta a pH 7.3.

- Se filtra con un filtro de 0.22 µm de tamaño de poro.

- Se conserva a 4°C hasta un máximo de 6 meses.

**S5. Tampón salino HeBS 2X**

- Esta solución se utiliza para la preparación de la mezcla de transfección de células HEK 293T, para la producción de lentivirus de alto título.

- Se prepara una solución de 500 mL de agua bi-distilada con NaCl 0.28 M, HEPES 0.05 M y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 M.

- Se ajusta el pH a 7 con NaOH 10 M

- Filtrar con un tamaño de poro de 0.22 µm y conservar a 4°C, o a -80°C para más de 2 años.

**S6. Tampón TE (Tris-EDTA) 10X**

- Esta solución se utiliza para la preparación de la mezcla de transfección de células HEK 293T, para la producción de lentivirus de alto título.

- Se prepara una solución de Tris-HCl 0.1 M y EDTA 0.01 M en 1 L de agua bi-distilada. La solución queda a 10X y se guarda en la nevera a 4°C.

- Se diluye para conseguir una solución 0.1X.

**S7. Solución de inyección en la cola del *Xenopus tropicalis***

- Se prepara una solución con NaCl 100 mM, KCl 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM y HEPES 5 mM en 500 mL de agua bi-distilada.

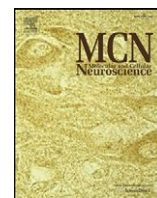
- La solución se ajusta a pH 7.8 y se filtra con un poro de diámetro 0.22 µm y se conserva a 4°C.

# PUBLICACIONES

*"Sabemos lo que somos pero no lo que podemos llegar  
a ser"*

William Shakespeare





## SPARC prevents maturation of cholinergic presynaptic terminals

David Albrecht, Francisco José López-Murcia, Anna P. Pérez-González, Gregor Lichtner, Carles Solsona, Artur Llobet\*

Laboratori de Neurobiologia, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 October 2011

Revised 21 December 2011

Accepted 12 January 2012

Available online 25 January 2012

#### Keywords:

SPARC  
Neuron–glia interactions  
Synaptic maturation  
Synaptic Vesicle Pools

### ABSTRACT

Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) is a matricellular protein produced by glial cells. Although it is highly expressed in synaptogenic areas in the developing nervous system, it is still unclear whether this molecule displays an action on synaptic activity. We show that nanomolar concentrations of SPARC favour a more efficient synapse formation and increase short term depression in single cell cholinergic microcultures. The change in synaptic plasticity, which is also observed when SPARC is locally secreted on stable synapses for 24–48 h, is caused by a high release probability and a reduction in the size of the rapidly releasable pool of vesicles. Both features are attributable to synapses operating at an immature stage as demonstrated by correlative electrophysiology and electron microscopy experiments. Presynaptic terminals developed in the presence of SPARC display few cytoplasmic vesicles and two to threefold decrease in the number of docked vesicles at active zones. At the postsynaptic level, the analysis of miniature excitatory postsynaptic currents suggests SPARC has little effect on the number of nicotinic receptors but might alter their composition. The widespread distribution of SPARC makes current findings potentially relevant to other excitatory synapses and development of neuronal circuits.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Neurons and glia are intimately coupled in all parts of the nervous system and contribute together to sensory, motor and integrative functions (Petzold et al., 2008; Robitaille, 1998; Schummers et al., 2008). From the early stages of development, glial cells actively participate in the wiring of neural circuits, first promoting synaptogenesis and, as maturation takes place, directly mediating information processing (Pfrieger, 2010). Matricellular proteins are key to the role of glia in synaptogenesis (Eroglu, 2009). Proteins such as thrombospondin, Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC), tenascin C and hevin, all act as modulators of cell matrix interactions and show changes in expression patterns throughout development suggesting their involvement in the establishment, maturation and maintenance of synaptic contacts. The most direct evidence for such a role has been provided for thrombospondin, which participates in the establishment of synapses (Christopherson et al., 2005). However, it is not clear whether other matricellular proteins regulate synapse formation, nor how any might regulate synaptic function.

Several pieces of information prompted us to investigate how SPARC might regulate synaptic functions. In addition to its widespread distribution throughout the nervous system, this protein is particularly enriched around synapses in the hippocampus and in

synaptogenic areas during development (Mendis and Brown, 1994; Mendis et al., 1995), shows high expression levels in some neurogenic niches in the adult brain (Vincent et al., 2008) and becomes upregulated in nervous tissue upon injury (Liu et al., 2005). Such evidences suggest that SPARC could be potentially effective both on developing and stable synapses. On the other hand, there are no obvious nervous defects in SPARC null mice (Gilmour et al., 1998), or knock out mice established for other matricellular proteins (Christopherson et al., 2005; McKinnon et al., 2000). It is unclear whether this represents an actual absence of function, or redundancy within this family of proteins. Recently, it has been proposed that SPARC acts as a negative regulator of synapse formation by antagonizing the action of hevin (Kucukdereli et al., 2011), a possible direct effect of SPARC on synapses, remains however unresolved.

To investigate a potential role of SPARC in controlling synaptic functions, we used cholinergic microcultures established from the superior cervical ganglion of newborn rats. In these experimental conditions a single neuron successfully establishes nicotinic autapses in the absence of glial cells (Perez-Gonzalez et al., 2008). The main advantage to other neuronal microcultures is, that the concentration of any glial secreted factor in the culture medium can be controlled and deliberately modified because neurons do not grow onto a feeder layer of cells. By using this approach we show that nanomolar concentrations of SPARC aid formation of synaptic contacts but arrest them to a stage characterized by a high probability of release and a small rapidly releasable pool of vesicles, which are two typical properties of immature synapses.

\* Corresponding author at: Laboratori de Neurobiologia-IDIBELL, Pavelló de Govern, Lab. 4112, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain.  
E-mail address: [allobet@ub.edu](mailto:allobet@ub.edu) (A. Llobet).



## Results

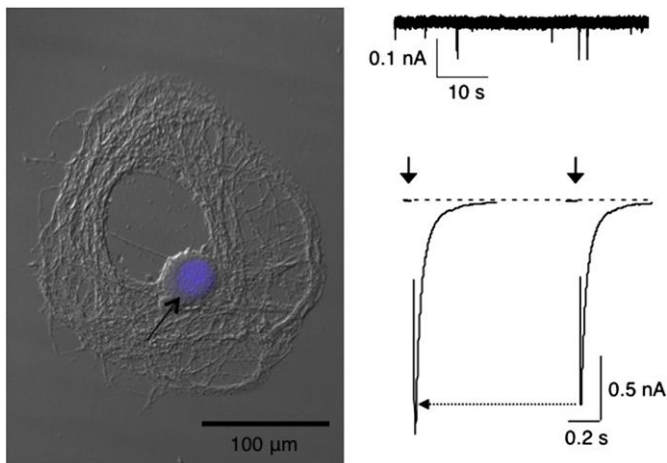
### Cholinergic autapses developed in the absence of glia show stereotyped neurotransmission features

Cholinergic autapses were studied in microcultures of isolated rat superior cervical ganglion neurons, what we termed Single Cell Microcultures (SCMs, Fig. 1). In this condition,  $45 \pm 4\%$  of neurons ( $n = 352$ , 48 cultures) showed functional autapses. Neurotransmission displayed a stereotyped profile in  $2 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_e$  (see also Perez-Gonzalez et al., 2008): very low, or even absent spontaneous activity and depression for paired pulses delivered at intervals shorter than 1 s. To certify the presence of a single cell, neurons were fixed and nucleic acids were stained at the end of a recording episode (Fig. 1). Those microcultures showing more than one nuclei were not considered, since they reflected the presence of glial cells or more than one neuron (see Experimental Methods section for details). Selecting functional neuronal microcultures devoid of non-neuronal cells was key to this study, because when present, peripheral glial cells enhance spontaneous activity and short term depression, as previously reported (Perez-Gonzalez et al., 2008).

### Glial cells generate nanomolar concentrations of SPARC in the extracellular space

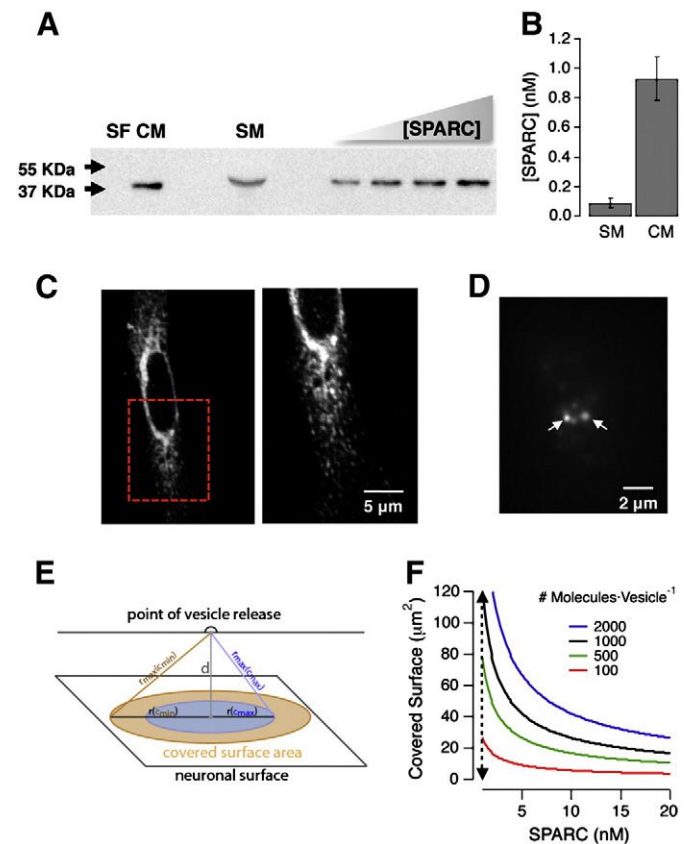
To test for a possible effect of SPARC on synapses, we first sought to establish whether this matricellular protein was already present in control conditions. The addition of 2.5% rat serum and 2.5% foetal bovine serum to the culture medium supporting the growth of SCMs provided  $\sim 0.1 \text{ nM}$  basal concentration of SPARC in a single culture well, as revealed by western blot and ELISA analysis (Figs. 2A and B). Conditioned medium from cultures of peripheral glial cells obtained from the superior cervical ganglion showed however, higher concentrations of this matricellular protein, around  $1 \text{ nM}$ . This observation led us to infer that SPARC could be signalling on neurons at a nanomolar concentration.

To obtain an estimate on the biologically relevant concentrations of SPARC in the neuroglial space, we modelled the diffusion of the matricellular protein upon release from a single vesicle (see Experimental methods section for a full description of the model). Two assumptions were made based on experimental observations:



**Fig. 1.** Cholinergic Single Cell Microcultures (SCMs) show stereotyped neurotransmission features. Left, differential interference contrast image of a SCM. Staining of nucleic acids denotes the presence of a single nucleus. Right, typical recordings of spontaneous (up) and evoked cholinergic autaptic responses. Sodium currents were cancelled for illustration purposes. Solid and dotted arrows indicate application of stimuli and paired pulse ratio, respectively.

i) peripheral glial cells stored SPARC into secretory vesicles below resolution of optical microscopy (i.e.  $200 \text{ nm}$ , Figs. 2C and D) and ii) the distance between neuronal and glial membranes was  $20$  to  $40 \text{ nm}$  (Ventura and Harris, 1999). Since the number of SPARC copies packed into a vesicle was the main determinant of protein concentrations in the extracellular space after release (see Experimental methods section), four situations were drawn assuming the number of molecules ranged from  $100$  to  $2000$ . These figures were chosen after estimating the volume of a single SPARC molecule from structural data (Hohenester et al., 2008). Our calculations showed the contents of a single average vesicle would at least cover  $30 \mu\text{m}^2$  of neuronal surface at a concentration  $\geq 1 \text{ nM}$  (Fig. 2F). Hence, a nanomolar [SPARC] could be achieved around the entire surface of a  $10 \mu\text{m}$  diameter neuronal cell body by the release of  $6$ – $7$  vesicles from wrapping glial cells. Likely, the marked release of SPARC observed during embryogenesis or at neurogenic niches in the adult brain, reflects nanomolar concentrations of the protein in the neuroglial space.



**Fig. 2.** Glial cells secrete nanomolar concentrations of SPARC on synapses. A) Western blot analysis of SPARC production by peripheral glial cells. SF: serum free medium; CM: conditioned medium obtained in serum free conditions; SM: control culture medium used to grow SCMs containing 2.5% foetal bovine serum and 2.5% rat serum; SPARC: Recombinant murine SPARC applied at  $5 \text{ ng}$ ,  $10 \text{ ng}$ ,  $15 \text{ ng}$  and  $20 \text{ ng}$ . CM and SM were obtained from a single  $3.8 \text{ cm}^2$  well and concentrated 8 times. Note the higher [SPARC] in CM compared to the SM. B) Quantification of [SPARC] in CMs ( $n = 3$ ) and SMs ( $n = 5$ ) by ELISA. C) Visualization of SPARC-GFP in a transfected peripheral glial cell shows the targeting of the protein to vesicular structures. Image on the right is a magnification of the area indicated by the red dotted box. D) Footprint of a COS-7 cell transfected with SPARC-GFP observed by total internal reflection fluorescence microscopy. Arrows point out two vesicles containing the construct. E) Diagram showing the geometrical considerations used to model the diffusion of SPARC in the neuroglial space upon release from a single vesicle. The model estimates the neuronal surface covered by SPARC for a concentration range found within  $c_{\text{min}}$  and  $c_{\text{max}}$ , located at a distance ( $d$ ) from the glial cell membrane. F) Neuronal surface covered at a nanomolar concentration of SPARC, setting  $c_{\text{min}}$  to  $1 \text{ nM}$ ,  $c_{\text{max}}$  to  $1 \mu\text{M}$  and  $d = 40 \text{ nm}$ . Four situations are drawn, assuming a single vesicle contains from  $100$  to  $2000$  molecule copies. Arrowed line indicates  $c_{\text{min}}$ .

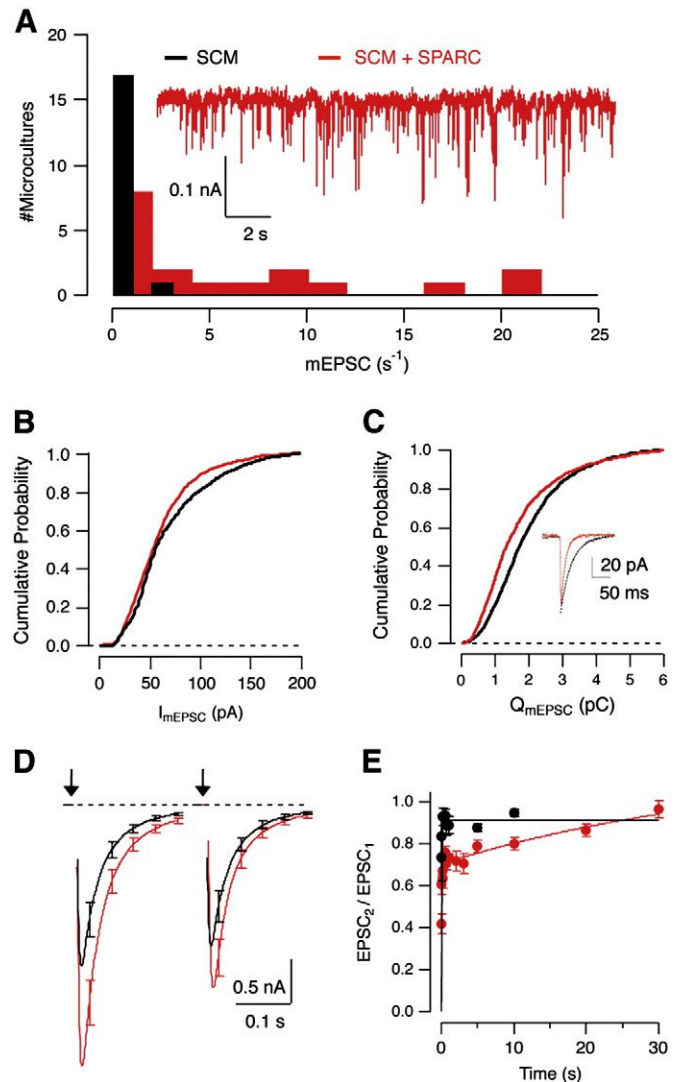
### Nanomolar concentrations of SPARC increase spontaneous neurotransmission and enhance short term depression of cholinergic autapses

When the basal concentration of SPARC in the culture medium (Fig. 2B) was increased by adding 10 ng/ml (0.24 nM) of the murine recombinant protein during the whole culture period, the characteristic neurotransmission features of control SCMs did not change (compare Suppl. Figs. 1A and B to Fig. 1). Spontaneous neurotransmission was very low and short term plasticity assayed by paired pulses showed the stereotyped behaviour of control SCMs. Paired pulse depression for a 1 s interval was  $0.82 \pm 0.03$  ( $n=9$ ), not significantly different from  $0.88 \pm 0.03$  ( $n=63$ ) obtained in control SCMs. Recovery from paired pulse depression occurred along a single exponential process with a time constant of 8 ms, similarly to the time course ( $\tau=24$  ms) found in control SCMs (see below Figs. 3E and 7F). Raising the concentration of SPARC to 100 ng/ml (~2.4 nM) throughout the culture period changed spontaneous and evoked neurotransmission: SCMs displayed a similar phenotype to cholinergic neuronal microcultures developed in the presence of peripheral glial cells (Perez-Gonzalez et al., 2008). Typically, control SCMs showed very little spontaneous activity, with miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) occurring at an average frequency of  $0.33 \pm 0.14$  s<sup>-1</sup> ( $n=18$ ). Synaptic Development in the presence of 2.4 nM SPARC increased spontaneous neurotransmission to an average frequency of  $5.91 \pm 1.8$  s<sup>-1</sup> ( $n=17$ ), with mEPSCs generally appearing in bursts (Fig. 3A). Miniature events were distributed within a wide range of frequencies, from 0.1 to 20 Hz but, only a third of recorded neurons displayed the characteristic spontaneous activity of control SCMs, below 1 Hz. The profile of mEPSCs was partially affected by SPARC. Application of the matricellular protein had no effect on the amplitude (Fig. 3B) but decreased the mean charge carried by miniature events from 1.7 pC to 1.4 pC ( $p<0.001$ , Fig. 3C). This difference was caused by a faster decay phase in neurons developed during 14–18 D.I.V. in 2.4 nM SPARC (Fig. 3C, inset) thus supporting a postsynaptic effect of the matricellular protein. The amplitude of mEPSCs is essentially related to the concentration of neurotransmitter released by a single vesicle and the postsynaptic receptor density (Lisman et al., 2007). In contrast, a faster decay is suggestive of alterations in the molecular composition of nicotinic receptors, as described elsewhere (David et al., 2010). This postsynaptic effect of SPARC was not related to the marked increase in the frequency of mEPSCs, which likely originated from presynaptic changes.

To assay for modifications in presynaptic terminal properties, short term plasticity was studied using paired pulse stimuli (Zucker and Regehr, 2002). In control SCMs, paired pulse ratio (EPSC<sub>2</sub>/EPSC<sub>1</sub>) was  $0.88 \pm 0.03$  ( $n=63$ ) when the stimulus interval was 1 s (Fig. 1). In contrast, the ratio was reduced to  $0.73 \pm 0.02$  ( $n=23$ ) at this same interval when 2.4 nM SPARC was present in the culture medium (Fig. 3D). The difference between the two groups arose from a faster recovery from depression observed in control conditions. In control SCMs, recovery followed a single exponential with a time constant of 24 ms, while in the presence of the matricellular protein, the time course became bi-exponential with fast and slow time constants of 23 ms and 42 s, respectively (Fig. 3E). Therefore, the presence of nanomolar concentrations of SPARC in the culture medium enhanced short term depression.

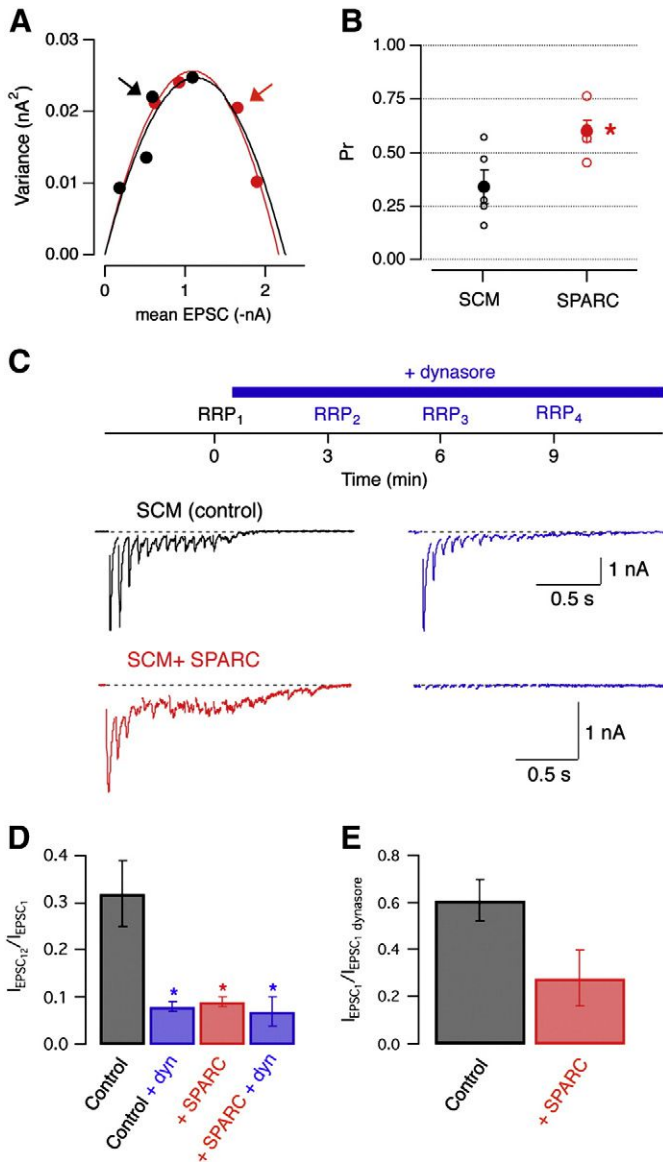
#### SPARC increases the probability of neurotransmitter release

Analysis of paired pulse stimuli showed that besides increasing short term depression, SPARC also increased synaptic potency, defined by the average EPSC amplitude. Fig. 3D shows the peak of the first EPSC used to study paired pulse ratio changed from  $2418 \pm 151$  pA in control SCMs ( $n=31$ ) to  $3104 \pm 191$  pA in SCMs developed with SPARC ( $n=23$ ,  $p<0.05$ ). The maximum value of an EPSC is described by the following equation:  $I_{EPSC} = Q \cdot Pr \cdot N$ , where  $Q$ ,  $Pr$  and  $N$ , refer to the average



**Fig. 3.** Effects of SPARC on mEPSC frequency and short-term depression. A) Distribution of mEPSC frequency in control SCMs (black) and SCMs developed during 14–18 D.I.V. with 2.4 nM SPARC (SCM + SPARC, red). Recording illustrates spontaneous activity of a neuron treated with SPARC. B) Distribution of mEPSC amplitudes in control SCMs ( $n=2098$ , 18 cells) and SCMs + SPARC ( $n=2177$ , 17 cells). C) Distribution of charges carried by mEPSCs in control SCMs ( $n=1430$ , 9 cells) and SCMs + SPARC ( $n=1510$ , 12 cells). The inset illustrates the average profile of a mEPSC, in both conditions (SCMs,  $n=33$  and SCMs + SPARC,  $n=336$ ). The exponential function describing the decay phase shows a slower time constant of 29 ms in the control SCM, compared to 12 ms in the neuron developed with SPARC. D) Plot of the average paired pulse ratio at 1 s interval in control SCMs (black,  $n=19$ ) and SCM + SPARC (red,  $n=12$ ). Error bars indicate 1 s.e.m. Note synaptic potency (amplitude of EPSC<sub>1</sub>) is increased in the SCM + SPARC group. E) Recovery from paired pulse depression obtained by delivering stimuli at time intervals ranging from 50 ms to 30 s in control SCMs (dots show  $n \geq 9$ ) and SCMs + SPARC (dots show  $n \geq 6$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  1 s.e.m. Recovery was fitted by a single exponential in SCMs ( $\tau=24$  ms) and a double exponential in SCMs + SPARC ( $\tau_{fast}=23$  ms,  $\tau_{slow}=42$  s).

current of a single mEPSC, the release probability and the number of independent release sites, respectively (Ikeda and Bekkers, 2009). Since application of SPARC did not modify the peak of mEPSCs (Fig. 3B), changes in current amplitude could thus be related to  $Pr$  and/or  $N$ . Although several studies associate the enhancement of paired pulse depression to an increase in  $Pr$  (Sakaba et al., 2002), the analysis of paired stimuli does not consider possible changes in  $N$ . We therefore carried out a variance-mean analysis by exposing synapses to varying  $[Ca^{2+}]_e$  that modified  $Pr$  (Fig. 4A, Clements and Silver, 2000). Autapses developed in the presence of SPARC showed in 2mM  $[Ca^{2+}]_e$  a higher  $Pr$  than control SCMs. There was a significant enhancement from  $0.34 \pm 0.08$  ( $n=5$ ) to  $0.6 \pm 0.05$



**Fig. 4.** Effect of SPARC on release probability and the size of synaptic vesicle pools. A) Variance–mean analysis of a control SCM (black) and a SCM developed with 2.4 nM SPARC (red). Each point represents a different release probability obtained at the following  $[Ca^{2+}]_e$ : 0.5 mM, 1 mM, 2 mM and 6 mM. Arrows indicate variance at 2 mM  $[Ca^{2+}]_e$ . B) Release probability calculated from the variance–mean analysis for SCMs developed with or without SPARC. Asterisk denotes a significant difference ( $p < 0.05$ ). Dots indicate mean  $\pm$  1 s.e.m. C) To reduce the size of presynaptic vesicle pools, three trains of stimuli delivered at 14 Hz were applied at 3 min intervals in the presence of dynasore. Recordings show RRP<sub>1</sub> and RRP<sub>4</sub> for two different cells. D) Analysis of depression during a stimulus train by calculating the ratio found for the 12th/1st EPSC. Error bars indicate 1 s.e.m. ( $p < 0.01$ ). E) The amplitude of the 1st EPSC of the train (synaptic potency) decreased after lowering available vesicles for release with dynasore. Reduction of synaptic potency was larger in SPARC treated neurons ( $p < 0.05$ ).

( $n = 5$ , Fig. 4B,  $p < 0.05$ ). As expected, the quantal parameter  $Q$  was not affected by SPARC, and average values of  $54 \pm 11$  pA ( $n = 5$ ) and  $69 \pm 10$  pA ( $n = 5$ ) were obtained in the absence and presence of the matricellular protein, respectively. In terms of  $N$ , there were no apparent changes, albeit this parameter showed a high degree of variability among cultures, ranging from 30 to 157. Consequently, the increase in short-term depression evoked by SPARC was mainly attributed to an elevation of  $Pr$  but, the wide distribution found for the quantal parameter  $N$  made unclear whether the matricellular protein was also affecting the number of release sites or the organization of vesicle pools.

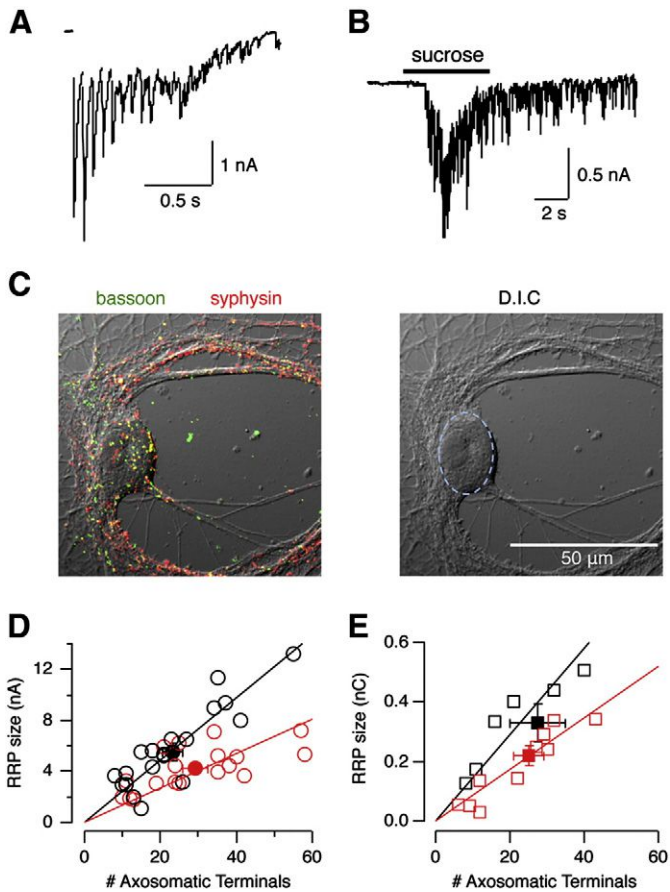
#### SPARC decreases the amount of synaptic vesicles available for release

Delivery of a train of stimuli at 14 Hz in 2 mM  $[Ca^{2+}]_e$  caused a progressive depression of evoked responses that was mainly attributed to depletion of vesicle pools (Fig. 4C, Zucker and Regehr, 2002). It was quantified by calculating the relationship between the amplitudes of the 12th and 1st EPSCs. The value of this *depletion ratio* in control SCMs was of  $0.29 \pm 0.07$  ( $n = 17$ ). To test whether depression during high frequency stimulation could indeed be attributed to emptying available vesicles for release, dynasore, an inhibitor of dynamin, was applied at 100  $\mu$ M. Having compensatory endocytosis blocked (Newton et al., 2006), three high frequency trains were delivered every 3 min during drug application, aiming to decrease the size of vesicle pools. As a result, control SCMs showed on the third train a significant decrease of their *depletion ratio* to  $0.08 \pm 0.01$  ( $n = 14$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 4D). Neurons developed in the presence of 2.4 nM SPARC presented a value of  $0.09 \pm 0.01$  ( $n = 25$ ), which was similar to control SCMs having their vesicle pools reduced by dynasore application. The possibility that SPARC treated neurons presented less available vesicles for release was further suggested when EPSCs were suppressed in 50% of neurons treated with dynasore (see example in Fig. 4C). Reduction in vesicle pool size decreased synaptic potency, defined as the amplitude of the first EPSC of the train. This parameter was reduced to 60% in control SCMs but in SPARC treated neurons the effect was more marked, lowering its value down to ~20% ( $p < 0.05$ , Fig. 4E). Taken altogether, these results suggested SPARC treatment decreased the number of vesicles available for release in a presynaptic terminal.

#### The size of the Rapidly Releasable Pool of vesicles is reduced by SPARC

The Rapidly Releasable Pool (RRP) is defined by those vesicles docked to the active zone, which are rapidly released when a stimulus arrives to the presynaptic terminal. Since this set of vesicles is the most significant contributor to short term plasticity, we investigated whether SPARC modified the RRP size analysing trains of stimuli (Fig. 5A, Sakaba et al., 2002). In control SCMs and SCMs developed with 2.4 nM SPARC, the size of this particular pool was of  $5372 \pm 421$  pA ( $n = 48$ ) and  $4898 \pm 356$  ( $n = 38$ ), respectively. Hence, SPARC non significantly reduced the current associated to the RRP by a 10% ( $p = 0.4$ ). Calculations based on a stimulus train typically result in underestimated RRP values since phenomena contributing to depression such as inactivation of presynaptic voltage gated calcium channels are not taken into account. In addition, the increased release probability and spontaneous activity observed by SPARC treatment could also interfere with evoked responses during high frequency trains. To overcome these limitations, the RRP size was also estimated using local application of a hypertonic sucrose solution (Fig. 5B). In this set of experiments neurons were silenced with TTX 24–48 h before recording to minimize depletion of vesicle pools by spontaneous activity. Control SCMs showed a RRP of  $390 \pm 47$  pC, about two times the size of SPARC treated neurons ( $182 \pm 36$  pC,  $p < 0.01$ ). Because both methodologies used to calculate the RRP made reference to the whole population of synapses recorded, measurements were refined performing correlative electrophysiology and confocal experiments. The aim was to obtain an approximate calculation of the number of vesicles comprising the RRP of a single autapse.

To visualize synaptic contacts by optical microscopy, neurons were stained after recording for two presynaptic markers: synaptophysin (presynaptic vesicles) and bassoon (active zones). Count of co-localized marks with somatic location (see Experimental Methods for details), provided an estimate of the number of terminals that more substantially contributed to evoked responses (Fig. 5C). Dendritic labelling was not taken into account because space-clamp limitations and cable-filtering properties likely reduced the contribution of synapses found in these processes (Ulrich and Lüscher, 1993).

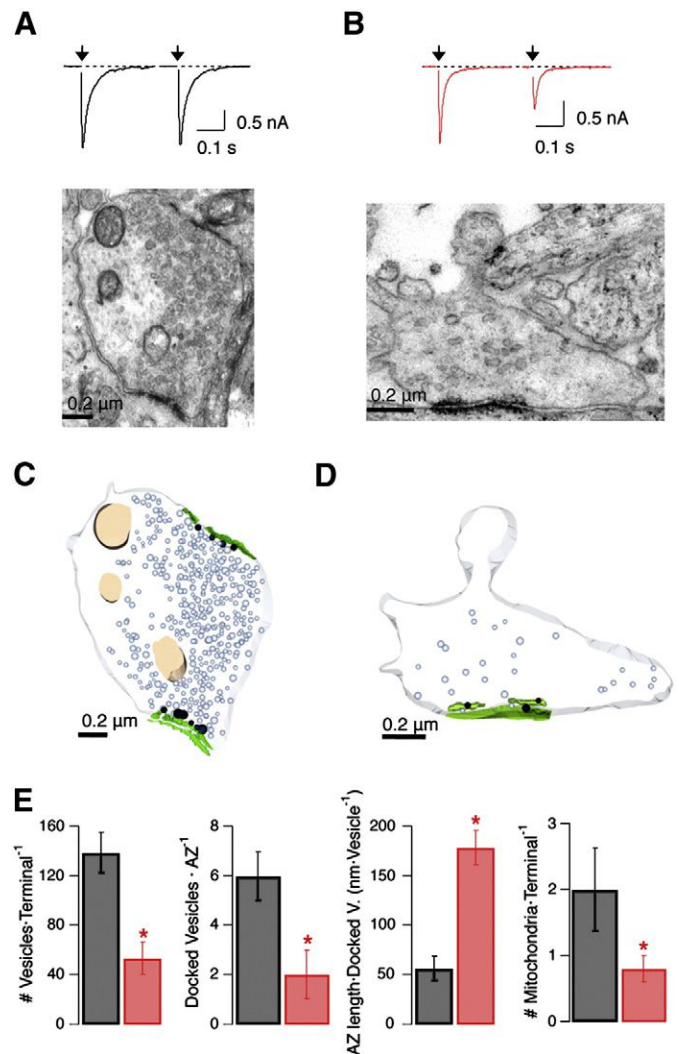


**Fig. 5.** Effect of SPARC on the size of the Rapidly Releasable Pool (RRP) of vesicles. A, B) Experimental methods used to calculate the RRP. High frequency train and local application of a hypertonic sucrose solution. C) Projection of confocal sections obtained from a recorded neuron stained for bassoon (green) and synaptophysin (red). Somatic area was defined from the D.I.C. image (dotted line). D) Plot of RRP size calculated from trains of stimuli, against the number of presynaptic terminals with somatic location counted from stained neurons. Two independent linear fits to control SCMs (black) and SCMs developed in 2.4 nM SPARC (red) determine that a single axosomatic terminal is contributing to the RRP with 245 pA and 134 pA, respectively. Bins show mean  $\pm$  1 s.e.m for each group. E) Plot of RRP size calculated after local application of a hypertonic solution, against the number of presynaptic terminals estimated from confocal images. The independent linear fits determine a single axosomatic terminal contributes to the total RRP with 14.8 pC and 8.6 pC in control SCMs and SCMs treated with 2.4 nM SPARC.

Plot of the total RRP size obtained by a high frequency train or sucrose application, against the number of axosomatic terminals, showed a wide distribution for control SCMs and SCMs developed with 2.4 nM SPARC (Figs. 5D and E). Both groups were well fitted by independent linear functions, providing four different estimates. Contribution of a single autapse to the total RRP in control SCMs was 245 pA ( $r=0.89$ ) or 14.8 pC ( $r=0.93$ ). For neurons treated with 2.4 nM SPARC, a single synapse contributed 134 pA per terminal ( $r=0.67$ ) or 8.6 pC ( $r=0.94$ ). Thus, development in the presence of the matricellular protein decreased the slope of the linear functions relating the total RRP size and the number of axosomatic presynaptic terminals. Assuming a homogenous population synapses, and considering the average current and charge for a control mEPSC were 60 pA and 1.7 pC (Figs. 3B and C), the RRP in a control presynaptic terminal would be defined by  $\sim$ 4–9 vesicles. For neurons treated with 2.4 nM SPARC, and considering the charge carried by a mEPSC was 1.4 pC (Fig. 3C), the RRP size would be decreased to about its half, down to  $\sim$ 2–6 vesicles.

To confirm the effect of SPARC on RRP size, correlative electrophysiology and electron microscopy experiments were performed. The aim was to quantify the number of docked vesicles at the active

zone, which is determinant of the RRP size in hippocampal boutons (Schikorski and Stevens, 2001) or retinal bipolar neurons (von Gersdorff et al., 1996). Control and SPARC treated SCMs, displaying their characteristic paired pulse plasticity, were processed for electron microscopy (Figs. 6A and B). Both groups showed synaptic boutons of similar size, with a mean diameter of  $1.13 \pm 0.1 \mu\text{m}$  (control SCMs,  $n=4$ ) and  $1.10 \pm 0.13 \mu\text{m}$  (SCMs + 2.4 nM SPARC,  $n=10$ ). In agreement with dynasore experiments (Figs. 4C–E), control SCMs showed about 3 times more cytoplasmic vesicles than SCMs developed in 2.4 nM SPARC. Specifically, a 60 nm section of a control pre-synaptic terminal showed  $139 \pm 16$  vesicles (Fig. 6C,  $n=6$  synapses, 4 neurons), resembling synapses described elsewhere (Furshpan et al., 1986). In contrast, the presence of SPARC decreased this figure to  $53 \pm 13$  vesicles (Fig. 6D,  $n=10$  synapses, 3 neurons). Moreover, SPARC also modified the number of docked vesicles at active zones, decreasing from  $6 \pm 1$  in control SCMs to  $2 \pm 1$  in SCMs developed with SPARC (Fig. 6E). Pre and postsynaptic densities were obvious



**Fig. 6.** Effect of SPARC on the ultrastructure of cholinergic presynaptic terminals. A, B) Correlative electrophysiology and electron microscopy experiments. Paired pulse recordings obtained after delivering two stimuli at 1 s interval in a control SCM cultured for 16 D.I.V. (A) and a SCM developed in 2.4 nM SPARC for 15 D.I.V. (B). Synaptic potency was similar in both neurons but notice the enhancement of depression in the presence of SPARC. Micrographs show section of a presynaptic terminal from each neuron. Although synaptic densities are obvious in both terminals, the SPARC treated neuron shows few synaptic vesicles. C, D) Three-dimensional reconstruction of synapses shown in A and B, respectively. Docked vesicles at the active zone are coloured in black and cytoplasmic vesicles in light blue. E) Summary of electron microscopy data. Significance level is  $p < 0.01$ .

in both conditions tested, showing similar lengths of  $342 \pm 88$  nm ( $n=4$ ) and  $403 \pm 47$  nm ( $n=10$ ). These numbers accounted for one docked vesicle in  $105 \times 105$  nm square at the active zone of a SPARC treated neuron, About three times lower than control synapses.

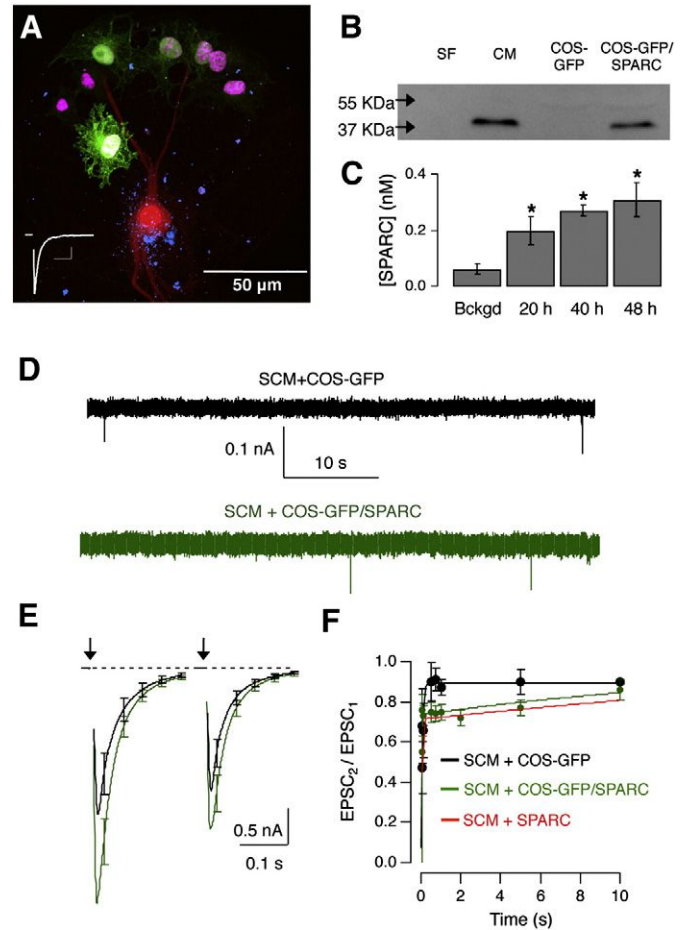
In summary, two different, complementary approaches, showed the size of the RRP was reduced to about its half in SPARC treated microcultures. This observation, alongside the overall reduction in cytoplasmic vesicles, shows presynaptic terminals developed in the presence of SPARC acquire an immature phenotype, similarly to cholinergic synapses of superior cervical ganglion neurons in vitro (Rees et al., 1976) and in vivo (Rubin, 1985).

#### Local release of SPARC enhances short term depression of autapses developed in the absence of glia

To generate an acute and localized release of SPARC, thus emulating gradients generated by glial cells under physiological conditions, transiently transfected COS-7 cells with GFP and SPARC were transferred onto already developed microcultures ( $\geq 14$  D.I.V.). In this experimental condition, which avoided use of the recombinantly produced protein, the matricellular protein was synthesized and secreted by COS-7 cells on the vicinity of established synapses, for 24 to 48 h. The number of GFP positive cells added to a microdot was variable, ranging from 0 up to 8 (Fig. 7A). Because it was considered only cells expressing GFP were able to secrete SPARC (Fig. 7B), those microcultures showing one or more fluorescent COS-7 cells were selected in this set of experiments. The following observations led to the assumption that the procedure described locally increased [SPARC] at a nanomolar range around autapses: *i*) COS-7 cells were closely located to neurons, with distances to the soma ranging from 1 to  $40 \mu\text{m}$ , *ii*) the number of SPARC producing cells was probably underestimated since transfection was carried out at a GFP:SPARC 1:4 ratio and the total number of cells added was typically 3 to 4 times the quantity of GFP positive cells (Fig. 7A), *iii*) microcultures were established on a collagen substrate, which binds SPARC very efficiently (Hohenester et al., 2008) and *iv*) added transfected COS-7 cells produced very efficiently the matricellular protein (Fig. 7B), enriching supernatants with  $\sim 0.3$  nM SPARC 48 h after plating (Fig. 7C). To correct for unspecific cell-to-neuron interactions, the control group was based on SCMs with added COS-7 cells expressing only GFP. As expected, in this condition spontaneous or evoked activity was not modified (Figs. 7D and E). A distinct result was obtained when the added COS-7 cells also secreted SPARC. Spontaneous activity was not affected, being again comparable to SCMs (Fig. 7D), but paired pulse depression and synaptic potency were enhanced. Recovery from depression followed a double exponential with fast and slow time constants of 9.5 ms and 19.8 s, respectively (Figs. 7F). Therefore, the effects of SPARC on short term plasticity were comparable when the protein was applied to the culture medium of developing microcultures or by local release on already established synapses.

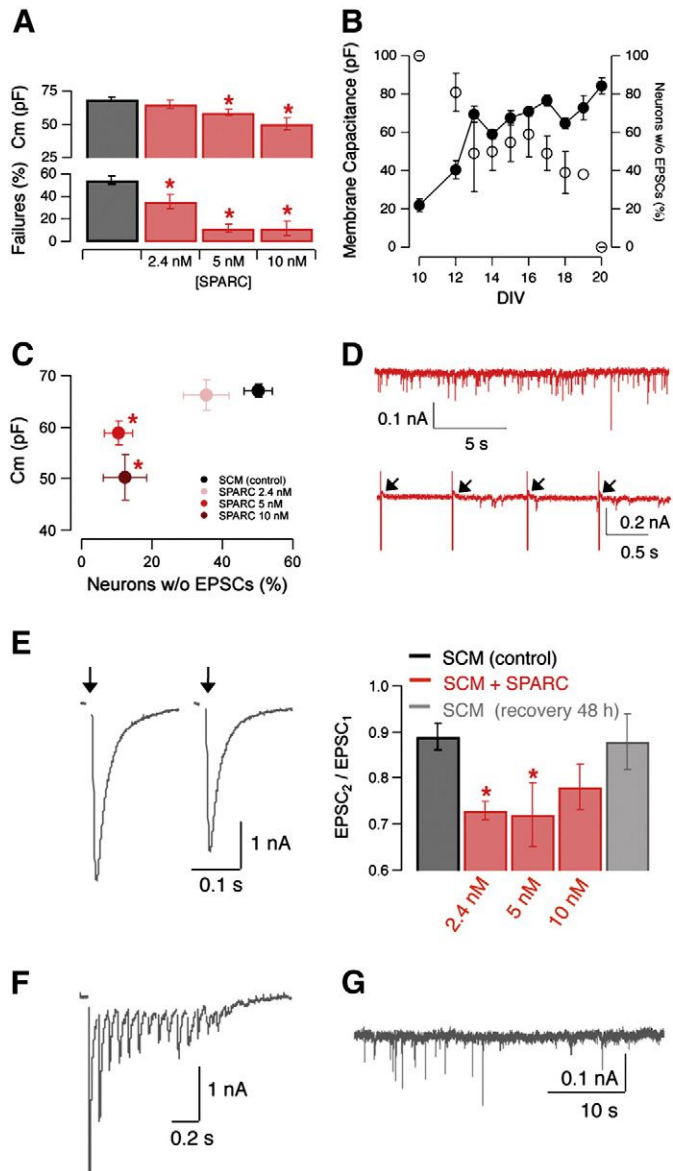
#### Concentration dependent effects of SPARC on the formation of cholinergic autapses

To gain a better understanding on the biologically relevant concentrations of SPARC to the described synaptic effects, the recombinant matricellular protein was applied at 5 nM, 10 nM and 25 nM for 14–18 D.I.V. Before assaying plasticity, two noticeable effects appeared. First, the likelihood of finding a given SCM displaying neurotransmission increased (Fig. 8A). As explained above  $55 \pm 4\%$  of control SCMs ( $n=352$ , 48 cultures), or  $61 \pm 5\%$  of SCMs exposed to 0.24 nM SPARC ( $n=30$ , 6 cultures) did not show neither evoked nor spontaneous events. Control figures were significantly reduced to  $34 \pm 6\%$  ( $p<0.01$ ,  $n=111$ , 19 cultures),  $12 \pm 6\%$  ( $p<0.01$ ,  $n=44$ , 5 cultures) and  $12 \pm 6\%$  ( $n=16$ , 3 cultures), in 2.4 nM, 5 nM and



**Fig. 7.** Local secretion of SPARC on established cholinergic autapses does not modify spontaneous activity. **A**) Image of a SCM containing at least three COS-7 cells expressing GFP within the collagen microdot. The autaptic current generated in this particular neuron is indicated in the inset (calibration bars 1 nA, 0.1 s). Neuronal processes, filled with the internal solution containing Alexa-555 are depicted in red. The location of presynaptic terminals is indicated by bassoon staining (blue). Nucleic acids are stained with DAPI (magenta). **B**) Western blot showing the ability of COS-7 cells co-transfected with plasmids codifying for GFP and SPARC to secrete the matricellular protein 36 h post-transfection. Lines were loaded with the following media: SF (serum free medium), CM (serum free medium conditioned by peripheral glial cells, as in Fig. 2A), COS-GFP (serum free medium conditioned by COS-7 cells transfected with GFP alone) and COS-GFP-SPARC (serum free medium conditioned by COS-7 cells transfected with GFP and SPARC). Supernatants were obtained from a single  $3.6 \text{ cm}^2$  well and concentrated 10 times. **C**) [SPARC] in supernatants of COS-7 cell cultures transfected with GFP and SPARC at 1:4 ratio collected 20 h, 40 h and 48 h after plating ( $n=4$ ). Background concentration present in the culture medium is also indicated ( $p<0.01$ ). **D**) Spontaneous activity of SCMs containing COS-7 cells expressing GFP (black) or GFP and SPARC (green). **E**) Effect of COS-7 cells locally producing SPARC on paired pulse depression studied at 1 s interval (green,  $n=18$ ). Black trace illustrates control experiments performed when COS-7 cells expressing GFP alone ( $n=10$ ). Error bars indicate 1 s.e.m. **F**) Paired pulse ratio plotted as a function of the time interval between pulses in SCMs containing COS-7 cells expressing GFP alone were added (control, black), or GFP and SPARC (green). Each dot represents mean  $\pm 1$  s.e.m. Recovery from depression was fitted by a single exponential ( $\tau=67$  ms) or a double exponential ( $\tau_{\text{fast}}=9.5$  ms and  $\tau_{\text{slow}}=20$  s). The time course obtained in the presence of 2.4 nM SPARC is shown in red for comparison (same as 3E).

10 nM SPARC, respectively. Second, application of the matricellular protein reduced neuronal surface, measured as membrane capacitance. In SCMs treated with 5 nM and 10 nM SPARC, the electrically accessible membrane was significantly decreased by 13% ( $p<0.05$ ) and 25% ( $p<0.05$ ), respectively. Higher concentrations of SPARC produced qualitatively similar results, however, application of 25 nM SPARC impaired neuronal adhesion to the collagen substrate, resulting in a low number of recordings ( $n=6$ ). In this condition one third of recorded neurons did not show neurotransmission,



**Fig. 8.** Concentration dependent effects of SPARC on synaptic activity. A) Effect of [SPARC] ranging from 2.4 nM to 10 nM on membrane capacitance and the proportion of microcultures failing to display autaptic neurotransmission ( $p < 0.05$ ). B) Membrane capacitance (dots) and proportion of control SCMs failing to display neurotransmission (open circles) plotted as a function of culture time, expressed in days in vitro, (D.I.V.). C) Relationship between membrane capacitance and SCMs failing to display neurotransmission found between 14 and 18 D.I.V. D) Recordings from a 14 D.I.V. neuron treated with 10 nM SPARC. Notice the high frequency of mEPSCs (up) but the failure to evoke neurotransmission (arrows, down). E) Paired pulse depression for a obtained at 1 s interval, in a neuron cultured for 16 D.I.V. 48 h after SPARC removal. Average values are indicated on the right. F) High frequency trains recovered their control profile after removing SPARC from culture medium (compare to Figs. 4C and 5A). G) The frequency of mEPSCs was below 1 Hz, 48 h after SPARC removal.

membrane capacitance was small,  $54 \pm 3$  pF, and paired pulse depression for a 1 s interval was  $0.81 \pm 0.06$ . Higher [SPARC] were not tested.

Development of cholinergic autaptic neurotransmission in vitro followed a characteristic time-course related to membrane capacitance. In agreement to previous works (Saadat et al., 1989) nicotinic EPSCs and spontaneous neurotransmission were detected in ~40–50% of neurons when membrane capacitance reached a 60–70 pF plateau after 13 D.I.V. (Fig. 8B). The relationship between membrane capacitance and the proportion of microcultures showing functional autapses showed the involvement of SPARC in synaptogenesis. This matricellular protein promoted more efficient formation of cholinergic autapses (Fig. 8C),

without significantly affecting the overall number of synaptic contacts (Figs. 5D and E).

Further evidence was supported by the enhancement of spontaneous activity (Fig. 3A), which is a hallmark of synapse formation in developing microcultures (Ullian et al., 2004). The experiment of a SCM exposed to 10 nM SPARC for 14 D.I.V. (Fig. 8D), reinforced this possibility. This particular cell displayed the characteristic high mEPSC frequency of SPARC treated neurons (compare to Fig. 3A) in the absence of evoked neurotransmission, which was suggestive of non-fully developed synaptic terminals. Poor coupling among voltage gated calcium channels and synaptic vesicles in ill-formed contacts could explain an increase of non-synchronous release of neurotransmitters.

Since the expression levels of SPARC decrease during development, it was necessary to test what were the effects of removing the matricellular protein from the culture medium. Cultures treated with SPARC for 16–18 D.I.V. were changed for 48 h to control conditions. As a result, paired pulse ratio for stimuli delivered at 1 s interval was  $0.88 \pm 0.06$  ( $n = 7$ ), undistinguishable from control SCMs (Fig. 8E). High frequency trains showed a depletion ratio of  $0.18 \pm 0.04$  ( $n = 7$ ), non significantly different from control SCMs ( $p = 0.3$ , Fig. 8F). And finally, mEPSC frequency was of  $0.33 \pm 0.09$  ( $n = 7$ ), again comparable to control neurons (Fig. 8G).

## Discussion

By mimicking a peak of SPARC production in cholinergic neuronal microcultures developed in the absence of glia, we demonstrate that this matricellular protein arrests presynaptic terminals to a stage characterized by a high release probability, a small RRP size and an overall decrease of synaptic vesicles, which are three characteristic features of immature synapses (Mozhayeva et al., 2002). These synaptic properties of SPARC are related to secretion of the molecule during central and peripheral nervous system development (Vincent et al., 2008), possibly suiting presynaptic terminals to the initial periods of neural circuit formation. In central synapses maturation of presynaptic terminals is designed to decrease release probability of neurotransmitters, resulting in an improved temporal processing of signals (Feldmeyer and Radnikow, 2009). A high release probability and a small RRP size would thus guarantee an efficient synaptic transmission with a limited capacity to information processing.

Our results support the composition of the extracellular matrix, and particularly, individual concentrations of matricellular proteins, as determinants of presynaptic function in developing and stable synapses. Comparison of the actions described for SPARC to thrombospondin, show both matricellular proteins are involved in synaptogenesis but to a different extent. While the action of thrombospondin is set to increase the number of ultrastructurally normal but postsynaptic silent excitatory synapses (Christopherson et al., 2005), SPARC function appears to be diverse. Its ability to enhance spontaneous activity and to increase the number of microcultures showing functional autapses, suggests is one among other factors secreted by glia favouring synapse formation. Recently it has been described that both thrombospondin and hevin promote establishment of synaptic contacts in retinal ganglion cells, being the action of hevin antagonized by SPARC (Kucukdereli et al., 2011). Our finding that cholinergic synapses are more efficiently formed in the presence of SPARC, stays in contrast to this observation, suggesting that the type of synapse involved is possibly a key determinant on the action of matricellular proteins. In this regard, thrombospondin does not promote formation of gabaergic synapses (Hughes et al., 2010). Noticeably, what appears to be the distinctive action of SPARC in our experimental conditions, setting synaptic contacts to an immature phenotype, agrees to findings obtained in glutamatergic synapses formed by retinal ganglion cells (Kucukdereli et al., 2011). Altogether these evidences demonstrate that SPARC is a glial secreted molecule able to modify synaptic activity, albeit its specific action is likely influenced by the particular composition of the extracellular matrix around synaptic types.

Although SPARC mediated effects are particularly relevant to pre-synaptic terminals, the analysis of spontaneous events suggests changes are also occurring at the postsynaptic level. Synapses developed in the presence of SPARC show mEPSCs with a faster decay phase, likely associated to an alteration in the molecular composition of nicotinic receptors. This change could be mediated by integrins, as described for AMPA receptors in glutamergic synapses (Jones et al., 2011). The capacity of integrins to interact with SPARC and acting as transducers of the extracellular matrix, suggests a putative role for these membrane receptors in the described presynaptic effects. Three evidences in support of this possibility are: *i*)  $\alpha 3$ -integrin forms a complex with presynaptic voltage gated calcium channels that binds active zone and cytoskeletal proteins in nicotinic synapses of Torpedo electric organ (Carlson et al., 2010), *ii*)  $\alpha 3\beta 1$  integrin complexes are widely present in the superior cervical ganglion (DeFreitas et al., 1995), and *iii*) SPARC interacts with integrin  $\beta 1$  heterodimers (Weaver et al., 2008). How integrin receptors could affect to the organization of vesicle pools is unknown. Nonetheless, the role of presynaptic actin, which interacts with integrin receptors and is key to the organization of synaptic vesicle pools (Pechstein and Shupliakov, 2010; Sakaba and Neher, 2003), should be explored because SPARC modifies the actin cytoskeleton of cultured endothelial cells (Murphy-Ullrich et al., 1995).

Finally, the ability of SPARC to act on stable synapses, could be required for particular events beyond development, such as synaptic remodelling after an injury, because the production of this matricellular protein is upregulated following tissue damage in the cortex (Mendis et al., 1998) or the olfactory bulb (Au et al., 2007). Glial cells could use the ability of SPARC setting synapses to an immature stage by generating a transient, favourable niche for establishing and/or consolidating new synaptic contacts. Although our results might suggest such action, this possibility still remains speculative.

## Experimental methods

### Cell culture and transfection experiments

Experimental procedures were approved by the Department of Environment from the Generalitat de Catalunya and registered under DMAH #5131. Single Cell Microcultures from Superior Cervical Ganglion (SCG) neurons were prepared following the method previously described using P0-P2 Sprague-Dawley rats (Perez-Gonzalez et al., 2008). Briefly, medium containing all dissociated cells was placed in a 100 mm diameter culture dish for 90 min at 37 °C. At the end of this pre-plate period  $\geq 95\%$  of non-neuronal cells were found adhered to the dish but most neurons remained in suspension. Medium was then collected and neurons seeded at 2500 cells·ml<sup>-1</sup> on 15 mm coverslips containing 10–20 collagen microdrops 100–400  $\mu$ m diameter (see Supplementary Fig.2 for details on the density of microislands). Culture medium was DMEM/F12 [1:1] containing 2.5% foetal bovine serum, 2.5% rat serum (prepared in the animal care facility of the University of Barcelona), 3–5 nM NGF, 2 nM CNTF (Alomone labs, Israel) and 25 U/ml penicillin/streptomycin at 37 °C and 8% CO<sub>2</sub>. In the indicated experiments mouse recombinant SPARC (R&D Systems, Minneapolis, US) was added at 0.24 nM, 2.4 nM, 5 nM, 10 nM or 25 nM.

Peripheral glial cells were cultured from dissociated superior cervical ganglia in DMEM/F12 [1:1] containing 5% foetal bovine serum and 100 U/ml penicillin/streptomycin at 37 °C and 8% CO<sub>2</sub>. When confluence was  $> 75\%$  cells were changed to serum free medium as described in (Ullian et al., 2004) but without BSA and maintained for 8 days. At the end of this period, medium was collected and concentrated using 10 kDa Amicon Ultra filter units (Millipore) to study SPARC production by western-blot and ELISA (see below). The identity of peripheral glial cells was checked by their positive staining for S100 $\beta$  (Perez-Gonzalez et al., 2008). Neuronal and peripheral glial cell cultures were established in 12-well dishes.

Rat SPARC cloned into pCMV-SPORT6 was obtained from Invitrogen (ID: 5621666). To achieve local secretion of SPARC on stable synapses, COS-7 cells were transfected with two separate plasmids, SPARC and GFP at 4:1 ratio using lipofectamine. The proportion of cells showing fluorescence was  $\sim 20\%$ . The number of COS-7 cells expressing GFP after being transferred to a microculture typically ranged from 0 to 8. To visualize the intracellular distribution of SPARC, a SPARC-GFP construct was created by inserting rat SPARC in pEGFP-N1. After lipofectamine transfection  $\sim 50\%$  of COS-7 cells and  $\sim 2\%$  of cultured peripheral glial cells displayed a punctate fluorescence, suggesting the presence of the construct in vesicular structures (Figs. 2C and D). COS-7 cells were seeded in 12-well dishes and grown in serum free conditions to investigate SPARC production.

### Electrophysiological recordings

All experiments were carried out in the whole-cell configuration of patch-clamp using neurons microcultured for 14–18 days in vitro (D.I.V.), a period when neurotransmission showed a similar profile (see also Fig. 8C). This time window was selected because: *i*) synaptic transmission was never observed before 10 D.I.V. (Perez-Gonzalez et al., 2008), *ii*) neurons displayed a comparable somatic surface, presenting an average capacitance of  $67 \pm 2$  pF ( $n = 386$ ) and *iii*) synaptic potency, paired pulse plasticity and the size of the RRP showed similar values. Typical resistances of pipettes used for recordings were 3–4 M $\Omega$  when filled with internal solution, whose composition was (in mM): 130 K-Gluconate, 4 MgCl<sub>2</sub>, 1 EGTA, 10 HEPES, 3 Na<sub>2</sub>ATP, 1 NaGTP, pH = 7.2, 290 mOsm/kg. In some experiments (Fig. 7A), 0.5 mM Alexa Fluor 555 hydrazide (Invitrogen) was added to the internal solution to trace neuronal morphology. External solution contained in mM: 130 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES-Hemisodium salt and 10 Glucose, pH = 7.4. The final CaCl<sub>2</sub> concentration was always achieved by dilution from a 1 M stock solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, US), and otherwise stated was 2 mM. All salts and dynasore were from Sigma-Aldrich, (St. Louis, US). Before the addition of glucose and CaCl<sub>2</sub>, the osmolality of the external solution was adjusted to 290 mOsm/kg. All experiments were performed at room temperature (20–23 °C).

Recordings were made using Axopatch-200B and Axopatch-1D patch clamp amplifiers (Molecular Devices, CA), under the control of ITC-18 boards (Instrutech, NY) driven by WCP software (Dr. John Dempster, University of Strathclyde, [http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/page.php?page=software\\_ses](http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/page.php?page=software_ses)). Neurons were clamped at  $-60$  mV and stimulated by a 1–2 ms depolarization step that drove membrane potential to 0 mV. Time interval between repeated stimuli was always  $\geq 30$  s.

### Analysis of electrophysiological data

Analysis was performed by custom made macros written in Igor Pro software 6.0 (Wavemetrics, OR). Neurons used in each experimental group came from six or more different cultures, depending on the condition. Calculation of RRP size from 14 Hz trains was carried out following the method described elsewhere (Perez-Gonzalez et al., 2008; Sakaba et al., 2002). The RRP size, expressed in pA, corresponded to the intercept on the ordinates axes of a linear fit to the steady-state phase of the cumulative plot of currents. Measurements of the RRP size were also done by local application of a hypertonic sucrose solution (500 mOsm/kg). RRP estimates obtained by this methodology, were larger than those calculated by high frequency stimulation. Both methods were linearly related ( $r = 0.96$ ), by a factor of 2.6 (see also Ikeda and Bekkers, 2009).

Recovery from paired pulse depression was analysed by fitting exponential functions. The decision between single and double exponential fits was made by visual inspection followed by comparison of residuals. A further criterion before accepting the need for a double

exponential over a single was that the two time constants should differ by more than one order of magnitude (Figs. 3E and 7F).

#### Immunocytochemistry and antibodies

Cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with Triton X-100. The following dilutions of primary antibodies were used: S100 $\beta$  (Dako, 1:1000), Synaptophysin (Synaptic Systems, 1:500) and Bassoon (Assay Designs, 1:1000). Overnight incubation with primary antibodies at 4°C, was followed by staining with secondary antibodies labelled with Alexa-488 and Alexa-555 (Invitrogen, 1:500).

#### Determination of SPARC concentration in supernatants

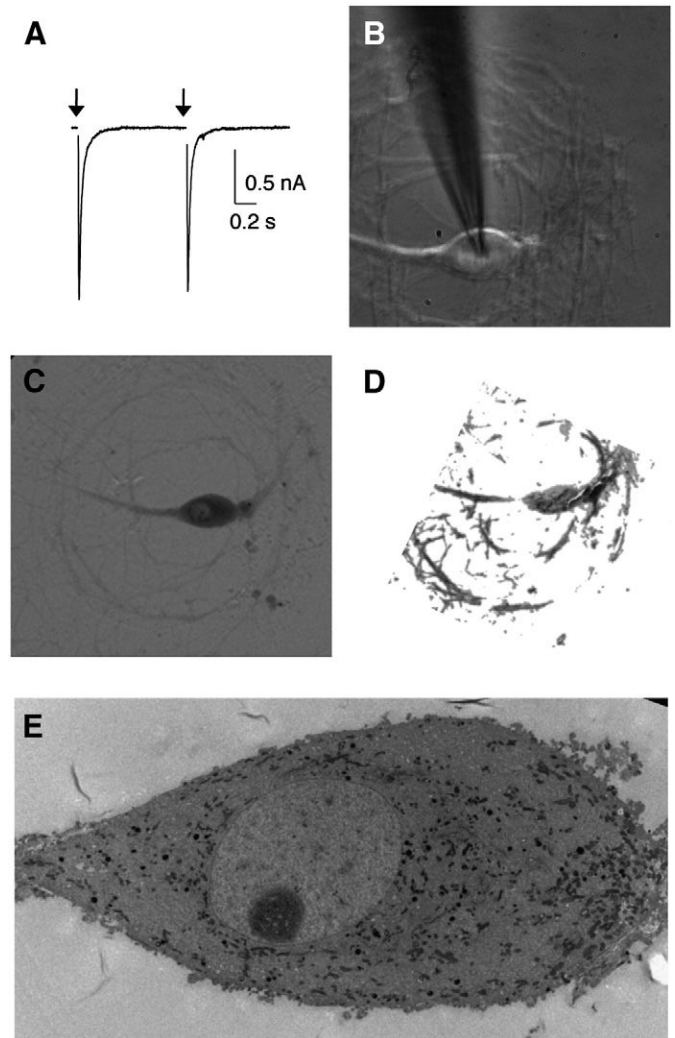
Production of SPARC was revealed by western blot analysis using a polyclonal antibody (R&D Systems, Minneapolis, AF942) at 1:500 dilution that identified a single band at ~40 kDa (Figs. 2A and 7B). Mouse recombinant SPARC was used as a positive control in all assays. To quantify protein concentrations in cell culture supernatants, indirect ELISA was performed using the above-mentioned SPARC polyclonal antibody at 1:500 dilution.

#### Correlative electrophysiology and confocal microscopy

At the end of a recording episode neurons were micrographed, fixed in paraformaldehyde 4% and stained for bassoon and synaptophysin. Quantification of presynaptic terminals contacting the soma was performed by Image J analysis of confocal sections. A synapse was defined as a round structure, where the two markers co-localized, with an apparent area of 0.3 to 3  $\mu\text{m}^2$  and spanning 3 to 5 confocal sections (~0.9–1.5  $\mu\text{m}$ ). The procedure was the following (see Fig. 5C): first, the somatic region was established from the D.I.C. image. After removal of background staining, maximum intensity projections were merged, thresholded and analysed within the defined region. Identified ROIs within the somatic surface were checked in each section of the stack, and those falling within the established criteria were counted as synapses.

#### Correlative electrophysiology and electron microscopy

After obtaining an estimate of paired pulse plasticity (Fig. 9A), neurons grown in thermanox coverslips (Nalgene) were micrographed (Fig. 9B) and fixed for 2 h at 4°C in 2.5% glutaraldehyde. To avoid an excessive depletion of vesicle pools, a minimal number of stimulation protocols were delivered (typically less than 5 paired pulse recordings). Fixed cells were washed in PB 0.1% and a region of interest was drawn with a razor blade around the recorded microculture for subsequent identification. Microcultures were then post-fixed with 1% osmium tetroxide/0.8% potassium ferricyanide, dehydrated and embedded in spurr resin. The area containing the recorded neuron was cut and embedded facing a spurr capsule. The remaining coverslip bit was removed and the recorded neuronal microculture identified in the resin block (Fig. 9C), before proceeding with semi-thin (Fig. 9D) and ultra-thin en-face sections using a Reichert-Jung Ultracut E microtome. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed in a Jeol 1010 electron microscope. Low magnification images confirmed the identity of the neuron (Fig. 9E). Quantification of vesicle numbers and locations were calculated in micrographs obtained at 80–150 K magnification. Synaptic vesicles were considered docked when distance to the plasma membrane could not be resolved. To illustrate vesicle distributions relative to active zones, reconstruction of two sections of the same postsynaptic density was performed using Reconstruct software (Fiala, 2005).



**Fig. 9.** Correlative electrophysiology and electron microscopy. Illustrative example of the method used to perform correlative electrophysiology and electron microscopy experiments. A) Paired pulse plasticity was assayed in a SCM by delivering two pulses at 1 s interval. B) Neuron was micrographed at the end of electrophysiological experiments. C) The recorded cell was fixed and identified in a spurr block. D) Semi-thin section of the recorded neuron. E) Low magnification image showing the soma of the studied neuron.

#### Statistical analysis

Data from averages are always expressed as mean  $\pm$  s.e.m. For statistical analysis, groups were compared using unpaired two-tailed Student's *t*-test. When comparing more than two groups ANOVA analysis with Bonferroni post-test was used. Significance level was set at  $p < 0.05$ .

#### Estimation of SPARC concentration in the neuroglial space upon release from a single vesicle

To obtain an estimate for [SPARC] achieved in the neuroglial space after release from a single vesicle, a model was designed starting from the second Fick's law of diffusion, which describes the time dependence of the (one dimensional) concentration gradient:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1)$$

Here *c* denotes the concentration, *t* time, *D* is the proportionality constant (termed diffusion coefficient) and *x* is the space coordinate. The transformation to spherical coordinates yields the following



equation, considering diffusion is constant and not to be dependent on the angle (radial diffusion, i.e.  $\partial c/\partial\phi = \partial c/\partial\theta = 0$ ):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \left[ \frac{2}{r} \frac{\partial c}{\partial r} + \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} \right]. \quad (2)$$

On the bases of previous approaches dealing with similar questions (i.e. estimation of the glutamate concentration in the synaptic cleft), it was assumed release of SPARC molecules to the neuroglial space behaved effectively as diffusion from a point source into an infinite medium (Barbour and Häusser, 1997). The solution  $c(r,t)$  of Fick's second law for a point source of molecules in an infinite three dimensional volume is as follows:

$$c(r, t) = \frac{M}{8(\pi Dt)^{3/2}} \cdot e^{-\frac{r^2}{4Dt}}. \quad (3)$$

Here  $M$  denotes the amount of protein being released from the point source (i.e. SPARC copies in a vesicle expressed in mol). Considering molecules cannot diffuse back into the cell, as they are hindered by the cell membrane, Eq. (3) needs to be multiplied by 2 to account for molecules being dispersed away from the vesicle towards the surrounding neuronal membrane (here considered as an infinite plane). We also introduce a factor of  $10^{-3}$ , to change the unit of  $c$  from  $\text{mol}/\text{m}^3$  to  $\text{mol}/\text{l}$ , which is more frequently used.

$$c(r, t) = \frac{M}{4 \cdot 10^3 (\pi Dt)^{3/2}} \cdot e^{-\frac{r^2}{4Dt}}. \quad (4)$$

To calculate the maximum distance where a certain concentration is reached regardless of time, it is first required to identify the point in time, when for a given distance  $r$ , concentration will reach its maximum. For this purpose, setting  $\partial c/\partial t = 0$  and solving the equation to  $t$ , yields the time when concentration is at its peak:

$$t_{c=\max} = \frac{r^2}{6D}. \quad (5)$$

Inserting Eq. (5) in Eq. (4) gives:

$$c_{\max}(r) = \frac{M}{4000 \cdot r^3} \cdot \left( \frac{6}{\pi e} \right)^{3/2}. \quad (6)$$

Rearranging Eq. (6) to  $r$  provides:

$$r_{\max}(c) = \left( \frac{M}{4000 \cdot c} \right)^{1/3} \cdot \sqrt{\frac{6}{\pi e}}. \quad (7)$$

Considering glial cells engulf synaptic terminals and neuronal membranes, it is assumed all SPARC molecules would be released onto a flat neuronal surface. On these bases, all points on the surface plane, whose distance to the point source are equal or less than  $r_{\max}$  are considered part of the covered surface. This area is described by a circle with the radius  $r = \sqrt{r_{\max}^2 - d^2}$ . As the surface  $A$  of a circle with radius  $r$  equals  $\pi \cdot r^2$ , this gives

$$A_{\text{covered,flat}} = \pi \cdot (r_{\max}^2 - d^2). \quad (8)$$

Thus, the neuronal surface covered at a given concentration by release of SPARC from a single vesicle was estimated by first calculating  $r_{\max}$  from Eq. (7) for a range of concentrations between  $c_{\min}$  and  $c_{\max}$ . Placing the resulting  $r_{\max}$  values in Eq. (8) provided the surface covered

by SPARC for a particular concentration range. To build the plot shown in Fig. 2F,  $c_{\min}$  was set to 1 nM and  $c_{\max}$  to 1  $\mu\text{M}$ .

## Author contributions

D.A, F.L, A.P., G.L. and C.S. collected, analysed and interpreted data. A.L. designed, performed and analysed experiments, wrote the paper.

## Acknowledgements

This work was supported by grant SAF2009-07620 to A.L. We thank Dr. Nuria Camarero for generating the SPARC-GFP construct, Serveis Científicotècnics-UB for their help with optical and electron microscopy and Dr. Leon Lagnado for critically reading the manuscript.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.mcn.2012.01.005.

## References

- Au, E., Richter, M., Vincent, A., Tetzlaff, W., Aebersold, R., Sage, E., Roskams, A., 2007. SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J. Neurosci.* 27, 7208–7221.
- Barbour, B., Häusser, M., 1997. Intersynaptic diffusion of neurotransmitter. *Trends Neurosci.* 20, 377–384.
- Carlson, S.S., Valdez, G., Sanes, J.R., 2010. Presynaptic calcium channels and  $\alpha 3$ -integrins are complexed with synaptic cleft laminins, cytoskeletal elements and active zone components. *J. Neurochem.* 115, 654–666.
- Christopherson, K., Ullian, E., Stokes, C., Mallowney, C., Hell, J., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D., Bornstein, P., Barres, B., 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421–433.
- Clements, J., Silver, R., 2000. Unveiling synaptic plasticity: a new graphical and analytical approach. *Trends Neurosci.* 23, 105–113.
- David, R., Ciusaszkiewicz, A., Simeone, X., Orr-Urtreger, A., Papke, R.L., McIntosh, J.M., Huck, S., Scholze, P., 2010. Biochemical and functional properties of distinct nicotinic acetylcholine receptors in the superior cervical ganglion of mice with targeted deletions of nAChR subunit genes. *Eur. J. Neurosci.* 31, 978–993.
- DeFreitas, M.F., Yoshida, C.K., Frazier, W.A., Mendrick, D.L., Kypta, R.M., Reichardt, L.F., 1995. Identification of integrin alpha 3 beta 1 as a neuronal thrombospondin receptor mediating neurite outgrowth. *Neuron* 15, 333–343.
- Eroglu, C., 2009. The role of astrocyte-secreted matricellular proteins in central nervous system development and function. *J. Cell Commun. Signal.* 3, 167–176.
- Feldmeyer, D., Radnikow, G., 2009. Developmental alterations in the functional properties of excitatory neocortical synapses. *J. Physiol.* 587, 1889–1896.
- Fiala, J.C., 2005. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J. Microsc.* 218, 52–61.
- Furshpan, E., Landis, S., Matsumoto, S., Potter, D., 1986. Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. I. Secretion of norepinephrine and acetylcholine. *J. Neurosci.* 6, 1061–1079.
- Gilmour, D., Lyon, G., Carlton, M., Sanes, J., Cunningham, J., Anderson, J., Hogan, B., Evans, M., Colledge, W., 1998. Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO J.* 17, 1860–1870.
- Hohenester, E., Sasaki, T., Giudici, C., Farndale, R., Bächinger, H., 2008. Structural basis of sequence-specific collagen recognition by SPARC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18273–18277.
- Hughes, E., Elmiah, S., Balice-Gordon, R., 2010. Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 43, 136–145.
- Ikeda, K., Bekkers, J., 2009. Counting the number of releasable synaptic vesicles in a presynaptic terminal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2945–2950.
- Jones, E.V., Bernardinelli, Y., Tse, Y.C., Chierzi, S., Wong, T.P., Murai, K.K., 2011. Astrocytes control glutamate receptor levels at developing synapses through SPARC-beta-integrin interactions. *J. Neurosci.* 31, 4154–4165.
- Kucukdereli, H., Allen, N.J., Lee, A.T., Feng, A., Ozlu, M.L., Conatser, L.M., Chakraborty, C., Workman, G., Weaver, M., Sage, E.H., Barres, B.A., Eroglu, C., 2011. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (32), E440–E449.
- Lisman, J.E., Raghavachari, S., Tsien, R.W., 2007. The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 597–609.
- Liu, X., Ying, G., Wang, W., Dong, J., Wang, Y., Ni, Z., Zhou, C., 2005. Entorhinal deafferentation induces upregulation of SPARC in the mouse hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 141, 58–65.
- McKinnon, P., McLaughlin, S., Kapsetaki, M., Margolskee, R., 2000. Extracellular matrix-associated protein Sc1 is not essential for mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 20, 656–660.

- Mendis, D., Brown, I., 1994. Expression of the gene encoding the extracellular matrix glycoprotein SPARC in the developing and adult mouse brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 24, 11–19.
- Mendis, D., Malaval, L., Brown, I., 1995. SPARC, an extracellular matrix glycoprotein containing the follistatin module, is expressed by astrocytes in synaptic enriched regions of the adult brain. *Brain Res.* 676, 69–79.
- Mendis, D.B., Ivy, G.O., Brown, I.R., 1998. SPARC/osteonectin mRNA is induced in blood vessels following injury to the adult rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 23, 1117–1123.
- Mozhayeva, M.G., Sara, Y., Liu, X., Kavalali, E.T., 2002. Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *J. Neurosci.* 22, 654–665.
- Murphy-Ullrich, J.E., Lane, T.F., Pallero, M.A., Sage, E.H., 1995. SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca<sup>2+</sup>-binding EF-hand. *J. Cell. Biochem.* 57, 341–350.
- Newton, A.J., Kirchhausen, T., Murthy, V.N., 2006. Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17955–17960.
- Pechstein, A., Shupliakov, O., 2010. Taking a back seat: synaptic vesicle clustering in presynaptic terminals. *Front. Synaptic Neurosci.* 2, 143.
- Perez-Gonzalez, A., Albrecht, D., Blasi, J., Llobet, A., 2008. Schwann cells modulate short-term plasticity of cholinergic autaptic synapses. *J. Physiol.* 586, 4675–4691.
- Petzold, C., Albeanu, D., Sato, T., Murthy, V., 2008. Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron* 58, 897–910.
- Pfrieger, F., 2010. Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Res. Rev.* 63, 39–46.
- Rees, R.P., Bunge, M.B., Bunge, R.P., 1976. Morphological changes in the neuritic growth cone and target neuron during synaptic junction development in culture. *J. Cell Biol.* 68, 240–263.
- Robitaille, R., 1998. Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* 21, 847–855.
- Rubin, E., 1985. Development of the rat superior cervical ganglion: initial stages of synapse formation. *J. Neurosci.* 5, 697–704.
- Saadat, S., Sendtner, M., Rohrer, H., 1989. Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J. Cell Biol.* 108, 1807–1816.
- Sakaba, T., Neher, E., 2003. Involvement of actin polymerization in vesicle recruitment at the calyx of Held synapse. *J. Neurosci.* 23, 837–846.
- Sakaba, T., Schneggenburger, R., Neher, E., 2002. Estimation of quantal parameters at the calyx of Held synapse. *Neurosci. Res.* 44, 343–356.
- Schikorski, T., Stevens, C.F., 2001. Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat. Neurosci.* 4, 391–395.
- Schummers, J., Yu, H., Sur, M., 2008. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science* 320, 1638–1643.
- Ullian, E., Harris, B., Wu, A., Chan, J., Barres, B., 2004. Schwann cells and astrocytes induce synapse formation by spinal motor neurons in culture. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 241–251.
- Ulrich, D., Lüscher, H., 1993. Miniature excitatory synaptic currents corrected for dendritic cable properties reveal quantal size and variance. *J. Neurophysiol.* 69, 1769–1773.
- Ventura, R., Harris, K.M., 1999. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J. Neurosci.* 19, 6897–6906.
- Vincent, A., Lau, P., Roskams, A., 2008. SPARC is expressed by macroglia and microglia in the developing and mature nervous system. *Dev. Dyn.* 237, 1449–1462.
- von Gersdorff, H., Vardi, E., Matthews, G., Sterling, P., 1996. Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron* 16, 1221–1227.
- Weaver, M.S., Workman, G., Sage, E.H., 2008. The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta1 and activation of integrin-linked kinase. *J. Biol. Chem.* 283, 22826–22837.
- Zucker, R., Regehr, W., 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355–405.



# Presynaptic Clathrin Levels Are a Limiting Factor for Synaptic Transmission

Francisco J. López-Murcia,<sup>1,2</sup>  Stephen J. Royle,<sup>3</sup> and  Artur Llobet<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Neurobiology, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), and <sup>2</sup>Department of Pathology and Experimental Therapeutics, Faculty of Medicine, University of Barcelona, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain, and <sup>3</sup>Division of Biomedical Cell Biology, Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry CV4 7AL, United Kingdom

To maintain communication, neurons must recycle their synaptic vesicles with high efficiency. This process places a huge burden on the clathrin-mediated endocytic machinery, but the consequences of this are poorly understood. We found that the amount of clathrin in a presynaptic terminal is not fixed. During stimulation, clathrin moves out of synapses as a function of stimulus strength and neurotransmitter release probability, which, together with membrane coat formation, transiently reduces the available pool of free clathrin triskelia. Correlative functional and morphological experiments in cholinergic autapses established by superior cervical ganglion neurons in culture show that presynaptic terminal function is compromised if clathrin levels fall by 20% after clathrin heavy chain knock down using RNAi. Synaptic transmission is depressed due to a reduction of cytoplasmic and readily releasable pools of vesicles. However, synaptic depression reverts after dialysis of exogenous clathrin, thus compensating RNAi-induced depletion. Lowering clathrin levels also reduces quantal size, which occurs concomitantly with a decrease in the size of synaptic vesicles. Large dense-core vesicles are unaffected by clathrin knock down. Together, our results show that clathrin levels are a dynamic property of presynaptic terminals that can influence short-term plasticity in a stimulus-dependent manner.

**Key words:** clathrin; endocytosis; presynaptic; short-term depression; synaptic vesicle; synaptic vesicle pools

## Introduction

Since the original description of clathrin as the major structural component of coated vesicles, it is generally considered that cells contain a virtually limitless reservoir of this protein (Pearse, 1976). In most cells, clathrin accounts for ~0.1–0.2% of the total protein content (Doxsey et al., 1987). This estimate is fivefold higher in neurons (Goud et al., 1985) and is higher still at synaptic terminals, where clathrin is enriched (Saheki and De Camilli, 2012). These elevated levels are required to maintain neuronal communication because clathrin-mediated endocytosis (CME) is the predominant mechanism used to recycle synaptic vesicles (Granstedt et al., 2006). Nonetheless, whether clathrin levels can become a limiting factor to presynaptic terminal function is still an open question.

An estimate of the available clathrin pool (ACP), or number of unassembled triskelia available for coat formation in a prototyp-

ical non-neuronal cell, can be drawn from previous work. Considering an average amount of  $0.5\text{--}1 \times 10^6$  clathrin triskelia/cell (Doxsey et al., 1987) and a ratio of assembled to unassembled clathrin of ~1 (Goud et al., 1985), the size of the ACP would be  $2.5\text{--}5 \times 10^5$  triskelia. Because clathrin-coated vesicles (CCVs) contain 36–60 triskelia (Cheng et al., 2007), a single cell could make hundreds of vesicles without significantly depleting the ACP. However, three observations suggest that the ACP can be limiting at neuronal synapses. First, presynaptic terminals can entirely release their readily release pool (RRP) within 1 s when stimulated at a high physiological frequency (i.e., 20 Hz). The instant release of ~2% of all synaptic vesicles present in the terminal (Rizzoli and Betz, 2005) and subsequent retrieval through CME operating with a time constant of ~15 s (Balaji and Ryan, 2007; Granstedt and Lagnado, 2008) would transiently reduce the concentration of free triskelia. Second, clathrin moves out of presynaptic terminals during stimulation. For example, stimulation of hippocampal boutons with 400 action potentials (APs) at 20 Hz causes an ~3% transient decrease in presynaptic clathrin concentration (Granstedt et al., 2006). Third, the lifetime of clathrin-coated intermediates is ~1 min (Miller and Heuser, 1984). Therefore, for a 20 Hz stimulation, the ACP would constantly decrease for 1200 APs.

Although these observations suggest that clathrin levels decrease significantly during high-frequency stimulation, the possible link between the reduction in the ACP and synaptic depression has not yet been investigated. Previous work has shown that, in non-neuronal cells, clathrin concentration in the

Received Dec. 5, 2013; revised May 19, 2014; accepted May 22, 2014.

Author contributions: S.J.R. and A.L. designed research; F.J.L.-M., S.J.R., and A.L. performed research; F.J.L.-M. and A.L. analyzed data; S.J.R. and A.L. wrote the paper.

This work was supported by El Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO Grant SAF 2012-36375 to A.L.) and Fundació La Marató de TV3 (A.L.). F.J.L.-M. was the recipient of a MINECO predoctoral fellowship (Grant BES-2010-032355). We thank the Electron Microscopy unit (Campus Casanova) of Centres Científics i Tecnològics of the University of Barcelona for their involvement and support and Rachel Jones for technical support.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to either of the following: Artur Llobet, Laboratory of Neurobiology, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain, E-mail: allobet@ub.edu; or Stephen Royle, Division of Biomedical Cell Biology, Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry CV4 7AL, UK, E-mail: S.J.Royle@warwick.ac.uk.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5081-13.2014

Copyright © 2014 the authors 0270-6474/14/348618-12\$15.00/0

cell is related to CME by a Hill function with a cooperativity index  $>6$ , such that small changes in clathrin levels lead to a significant impairment of endocytosis (Moskowitz et al., 2005). This conclusion was reached by performing a correlative analysis of transferrin receptor endocytosis and clathrin levels after RNAi of clathrin heavy chain (CHC) in a cell line. In the present study, we established a comparable experimental approach in a neuronal system: cholinergic autaptic single-cell microcultures (SCMs) (Perez-Gonzalez et al., 2008). We found that release of neurotransmitters is affected by decreases in clathrin levels that were as low as  $\sim 20\%$ , showing the high sensitivity of synaptic transmission to clathrin availability.

## Materials and Methods

**Molecular biology.** For expression of EGFP-tagged clathrin light chain (neuronal splice form), the coding sequence of GFP-nLCA was amplified by PCR to introduce MluI and Sall sites and was cloned into pWPT-GFP (plasmid 12255; Addgene), replacing GFP with GFP-nLCA. For CHC RNAi, pLVTHM vectors (plasmid 12247; Addgene) were used to coexpress shRNA and a GFP marker. Briefly, a ClaI-EcoRI fragment was exchanged with either pBrain-SpH-shGL2 (control) or pBrain-SpH-shCHC1 (rat CHC). GFP-nLCA and pBrain vectors were available from previous work (Royle et al., 2005). For lentivirus production, HEK 293T cells were transfected by the calcium phosphate method following methods described by Didier Trono (<http://tronolab.epfl.ch/lentivectors>) with pMD2G (plasmid 12259; Addgene), pCMVR8.74 (plasmid 22036; Addgene), and the appropriate pLVTHM constructs. Two days later, culture medium containing lentiviral particles was collected in 3 rounds at 8 h intervals, kept at  $4^{\circ}\text{C}$ , and centrifuged at  $500 \times g$ . Supernatants were aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Cell culture.** Experimental procedures were approved by the Department of Environment from the Generalitat de Catalunya. SCMs from superior cervical ganglion neurons were prepared following the previously described methods using postnatal day 0 (P0) to P2 Sprague Dawley rats (Perez-Gonzalez et al., 2008; Albrecht et al., 2012). Briefly, medium containing all dissociated ganglionic cells was placed in a 100-mm-diameter culture dish for 90 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . At the end of this preplating period,  $\geq 95\%$  of non-neuronal cells were found to be adhered to the dish, but most neurons remained in suspension. Medium was then collected and neurons seeded at  $2500 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$  on 15 mm coverslips containing 10–20 collagen microdrops of 100–400  $\mu\text{m}$  diameter. Culture medium was DMEM/F12 [1:1] containing 2.5% fetal bovine serum, 2.5% rat serum (prepared in the animal care facility of the Health Universitat de Barcelona campus), 3–5 nM NGF, 2 nM CNTF (Alomone Labs), and 25 U/ml penicillin/streptomycin at  $37^{\circ}\text{C}$  and 8%  $\text{CO}_2$ . To genetically modify SCMs, lentiviral infection was applied at 5 d *in vitro* (DIV) during a 1:2 overnight incubation of the appropriate viral stock. GFP fluorescence was evident 4–6 d after infection.

**Electrophysiological recordings and imaging.** All experiments were performed in the whole-cell configuration of patch-clamp mode using neurons microcultured for 16–20 DIV. Typical resistances of pipettes used for recordings were 3–5 M $\Omega$  when filled with internal solution composed of the following (in mM): 130 K-gluconate, 4  $\text{MgCl}_2$ , 1 EGTA, 10 HEPES, 3  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 1  $\text{NaGTP}$ , pH 7.2, 290 mOsm/kg. In the indicated experiments, the internal solution was supplemented with 0.25 mM purified clathrin and 0.2 mM 3 kDa-dextran conjugated to Texas Red (Life Technologies). External solution contained the following (in mM): 130 NaCl, 5 KCl, 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES-hemisodium salt, and 10 glucose, pH 7.4. The final  $\text{CaCl}_2$  concentration was always achieved by dilution from a 1 M stock solution and was 2 mM unless otherwise stated. All salts were from Sigma-Aldrich. Before the addition of glucose and  $\text{CaCl}_2$ , the osmolality of the external solution was adjusted to 290 mOsm/kg. All experiments were performed at room temperature ( $23^{\circ}\text{C}$ ).

Recordings were made using an Axopatch-1D patch-clamp amplifier (Molecular Devices) under the control of a ITC-18 board (Instrutech) driven by WCP software (Dr. John Dempster, University of Strathclyde). Neurons were clamped at  $-60 \text{ mV}$  and stimulated by a 1–2 ms depolar-

ization step that drove membrane potential to 0 mV. The presence of functional autaptic synapses was identified by the generation of EPSCs, which were observed in  $\sim 60\%$  of the SCMs. Miniature EPSCs (mEPSCs) were either absent or occurred at a frequency  $< 1 \text{ Hz}$ . Further details of neurotransmission in SCMs have been described previously (Perez-Gonzalez et al., 2008; Albrecht et al., 2012).

To visualize how neuronal activity affected clathrin dynamics at synapses, SCMs expressing GFP-nLCA were imaged and simultaneously recorded. Coverslips were mounted on an RC-25 imaging chamber (Warner Instruments) and imaged using an inverted Olympus IX-71 microscope. An argon laser excited GFP-nLCA at 488 nm and fluorescence was acquired using q505LP dichroic and HQ535/50 m emission filters (Chroma). Images were collected through a LD Plan-Neofluar 40 $\times$ , 0.6 numerical aperture (NA) (Zeiss) or Plan Apo 60 $\times$ , 1.45 NA (Olympus) objective and visualized on a EM-CCD C-9100 camera controlled by Hokawo software (Hamamatsu). Images from a  $310 \times 310$  pixel region of interest (ROI) located on the dendritic tree were acquired at 3 Hz. The somatic region was avoided because the high fluorescence levels precluded resolution of individual synapses. A transistor-transistor logic (TTL) pulse generated by WCP software controlled exposure time. Timing of laser light illumination was adjusted via a shutter (Uniblitz) to minimize photobleaching. In some experiments, synapses identified by staining and subsequent destaining with FM4–64 were recorded. In this particular condition, excitation was achieved via a 560/40 $\times$  filter and fluorescence emission was collected with a 610LP filter (Chroma).

**Analysis of electrophysiological and imaging data.** Analysis was performed with custom-made macros written in Igor Pro software version 6.0 (Wavemetrics). Calculation of RRP size from 15 Hz trains was performed following the method described previously (Sakaba et al., 2002; Perez-Gonzalez et al., 2008). Briefly, current evoked by release of the RRP was obtained by the intercept on the ordinates axes of a linear fit to the steady-state phase of the cumulative plot of currents. Measurements of the RRP size were also done by local application of a hypertonic sucrose solution (500 mOsm/kg). This method measured the charge carried by EPSCs (in picocoulombs) and always provided larger estimates than the previous method. Therefore, the RRP size was defined by both approximations, allowing the establishment of low and high estimates (Albrecht et al., 2012).

Relative changes to basal GFP-nLCA fluorescence ( $F_{\text{syn}}/F_{\text{syn}_0}$ ) were obtained for  $1.3 \times 1.3 \mu\text{m}$  ROIs centered on round,  $\sim 1\text{--}1.5 \mu\text{m}$  diameter structures where GFP-nLCA accumulated. Spots meeting this criterion were considered as synapses because immunostaining showed an almost complete colocalization of the construct with the vesicular proteins synaptophysin and VAMP-2. Typically, an imaging region contained two to seven putative synapses. This figure is in agreement with our electron micrographs of the dendritic tree of SCMs, where few consolidated synaptic contacts were obvious (data not shown, but see Furshpan et al., 1986). Puncta with an apparent diameter smaller than  $1 \mu\text{m}$  were not considered. Relative photobleaching ( $F_{\text{dend}}/F_{\text{dend}_0}$ ) was estimated from dendritic regions without synapses. To report changes in synaptic fluorescence ( $\Delta F$  GFP-nLCA), we subtracted the average photobleaching of three different ROIs from relative changes in basal GFP-nLCA fluorescence as follows:  $\Delta F = (F_{\text{syn}}/F_{\text{syn}_0}) - (F_{\text{dend}}/F_{\text{dend}_0})$ . Changes in fluorescence ( $\Delta F$ ) were only observed when stimulation evoked synaptic responses. In microcultures without functional autapses,  $\Delta F = 0$ .

**Correlative electrophysiology and optical or electron microscopy.** At the end of a recording episode, neurons were micrographed, fixed in 4% paraformaldehyde, and stained with the appropriate primary antibodies. The following dilutions were used: CHC (X22, 1:2500; Thermo Scientific), synaptophysin (1:500; Synaptic Systems) and Bassoon (1:1000; Assay Designs). Overnight incubation with primary antibodies at  $4^{\circ}\text{C}$  was followed by staining with secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, or Alexa Fluor 647 (1:500; Invitrogen).

Immunostained cultures were viewed by wide-field microscopy in a Zeiss Axio examiner A1. Images were acquired with an AxioCam MRC5 using Axiovision software. Quantification of CHC levels in recorded microcultures was performed in ImageJ software by measuring the average fluorescence from the whole soma and nearby dendritic tree on an

8-bit scale. To obtain relative CHC levels after knock down, acquisition settings were adjusted so that control somatodendritic regions provided fluorescence levels between 160 and 210 a.u. after subtracting background. No differences were found between estimates obtained by wide-field and confocal microscopy.

The procedure used for correlative electrophysiology and electron microscopy experiments has been described previously (Albrecht et al., 2012). Briefly, neurons grown in thermanox coverslips (Nalgene) were micrographed and fixed in 2% glutaraldehyde. Microcultures were post-fixed in 1% osmium tetroxide/0.8% potassium ferricyanide, dehydrated, and embedded in EPON resin. Sections of recorded neurons were stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed in a Jeol 1010 electron microscope.

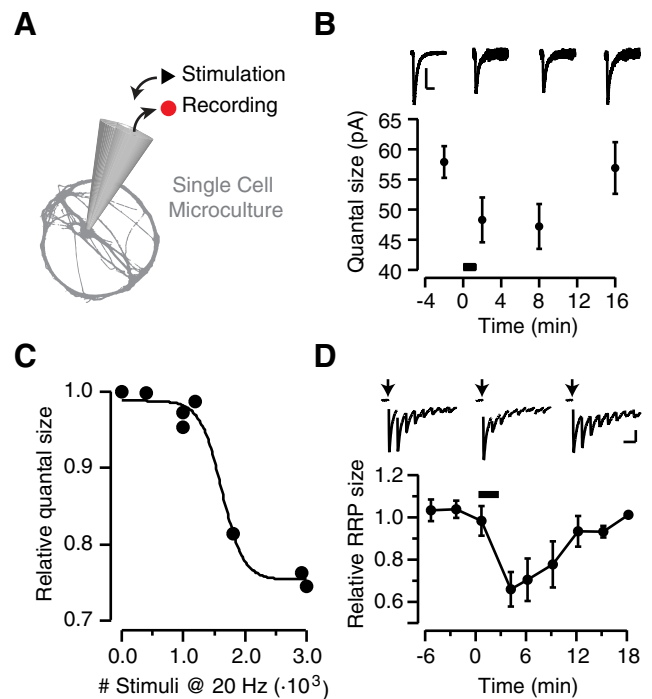
**Purification of clathrin from rat liver.** CCVs were purified from rat liver following a method described previously (Campbell et al., 1984; Kaur et al., 2014). Briefly, three rat livers were washed in cold HKM buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 125 mM potassium acetate, 5 mM magnesium acetate, and 1 mM DTT), diced, made up to 40 ml with HKM with protease mixture set III (catalog #539134; Calbiochem), and homogenized in a dounce homogenizer. All steps were performed on ice or at 4°C. The mixture was cleared by two centrifugation steps at 3800 × g. The supernatant was then ultracentrifuged at 45,000 rpm for 40 min in a 70Ti rotor (149000 × g). The resulting pellet was resuspended in 10 ml of HKM, homogenized, and an equal volume of HKM containing Ficoll (12.5% w/v) and sucrose (12.5% w/v) was added and mixed by inversion. The mixture was spun in a 70Ti rotor at 25,000 rpm for 20 min (46000 × g). CCVs were in the supernatant, which was then diluted with 3 volumes of HKM and spun at 36,000 rpm for 60 min in a 70Ti rotor (96000 × g). The pellet was resuspended in 15 ml of HKM, homogenized, and left on ice for 20 min. To pellet insoluble material, the suspension was spun at 17000 × g. Next, the supernatant was layered over a cushion of 8% (w/v) sucrose/HKM (equal volume) and spun at 22,000 rpm (~80,000 × g) in a swing-out rotor (SW41) for 2 h. The pellet was resuspended in 0.5 ml of uncoating buffer (1 M Tris-HCl pH 7.4 + 1 mM DTT), rotated for 1 h at 4°C, and vesicles pelleted out at 44,000 rpm (96,000 × g) in a Beckman MLA80 rotor for 25 min. Samples were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

**Statistical analysis.** Data from averages were always expressed as mean ± SEM. For statistical analysis, groups were compared using unpaired two-tailed Student's *t* test. When comparing more than two groups, ANOVA analysis with Bonferroni's *post hoc* test was used. Significance level was set at *p* < 0.05.

## Results

### High-frequency stimulation reduces quantal amplitude and the size of the RRP in cholinergic SCMs

For our experiments, we used SCMs (Fig. 1A) established from superior cervical ganglion neurons. This culture system allows cholinergic synapses to be studied in the absence of any other cell type and, because SCMs display a stereotyped neurotransmission (Perez-Gonzalez et al., 2008), short-term plasticity can be attributed exclusively to neuronal factors. We began by testing whether synaptic depression in SCMs was similar to other cholinergic synaptic systems. Application of a train of stimuli at 20 Hz frequency to a SCM evoked a decrease in quantal size that reverted in ~15 min (Fig. 1B), comparable to results obtained at the neuromuscular junction (Naves and Van der Kloot, 2001). A maximal reduction of 25% in quantal amplitude was observed when 20 Hz stimulation periods lasted 2.5 min. Quantal size was not affected by trains shorter than 1 min (Fig. 1C). Like quantal amplitude, the RRP was also affected after delivery of 3000 stimuli at 20 Hz. The number of immediately available vesicles decayed by ~30% and recovered within 15 min (Fig. 1D), again resembling previous findings in neuromuscular synapses (Wu and Betz, 1998). These results show that short-term depression mechanisms found at the neuromuscular junction are reproduced at

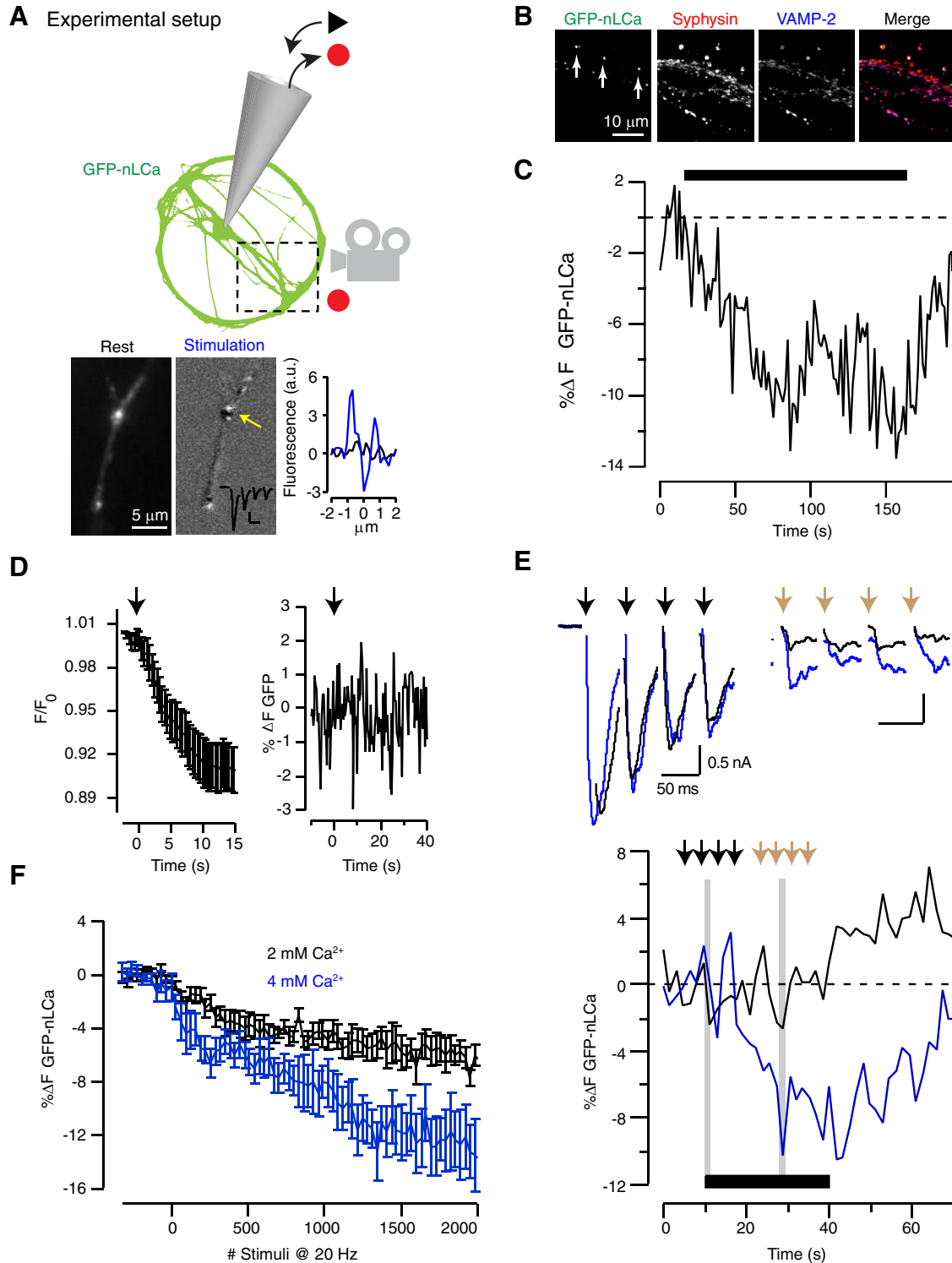


**Figure 1.** High-frequency stimulation reversibly reduces quantal size and the amount of available vesicles for release in cholinergic autaptic synapses. **A**, Schematic drawing showing the experimental setup used to record electrophysiological responses from SCMs. **B**, mEPSCs were measured in an SCM before and after delivery of a train of 1600 stimuli applied at 20 Hz. Recordings show average mEPSCs before and 2, 7, or 15 min after stimulation. Lower plot shows average variations in quantal size relative to stimulus application (bar). Notice recovery of quantal size 15 min after the application of the train. Scale bars, 20 pA, 50 ms. **C**, Plot of relative changes in quantal size after 20 Hz application of the indicated number of stimuli. Each dot indicates a single neuron. Individual data were fitted by a sigmoid function, estimating a half reduction in quantal size at 1624 stimulations. **D**, The RRP was reduced by ~30% after delivery of 3000 stimuli at 20 Hz. Like quantal size, recovery occurred within 15 min. The RRP was estimated from the cumulative analysis of synaptic responses obtained by applying 15 stimuli at 15 Hz (see Materials and Methods for details). Traces show EPSCs obtained before the application of a high-frequency train (left) and 3 min (middle) and 12 min (right) afterward. Each dot indicates mean ± SEM (*n* ≥ 5). Scale bars, 1 nA, 0.1 s.

SCMs and validate this preparation for the investigation of cholinergic synapse plasticity.

### Clathrin moves out of the synapse upon stimulation

Synaptic vesicle proteins move out of hippocampal presynaptic boutons upon high-frequency stimulation and are “followed” by clathrin presumably for extrasynaptic vesicle retrieval (Li et al., 2005; Fernández-Alfonso et al., 2006; Granseth et al., 2006). To determine whether clathrin also moves out of cholinergic synapses during high-frequency stimulation, SCMs were infected with lentiviruses to express GFP-nLCA, the neuronal isoform of clathrin light chain A tagged with enhanced GFP (Fig. 2A). The construct accumulated at presynaptic terminals, defined as ~1- to 1.5- $\mu$ m-diameter structures that colocalized with the vesicular proteins synaptophysin and VAMP-2 (Fig. 2B). Simultaneous electrophysiology recording and fluorescence microscopy allowed us to assess the movement of clathrin from synapses after controlled stimulation. Upon application of a stimulus train, GFP-nLCA fluorescence decreased at presynaptic terminals and, at the same time, increased in perisynaptic regions (Fig. 2A). This transient change in GFP-nLCA fluorescence (Fig. 2C) likely reflects movement of the construct out of the synapse upon stimulation, as described previously for hippocampal boutons



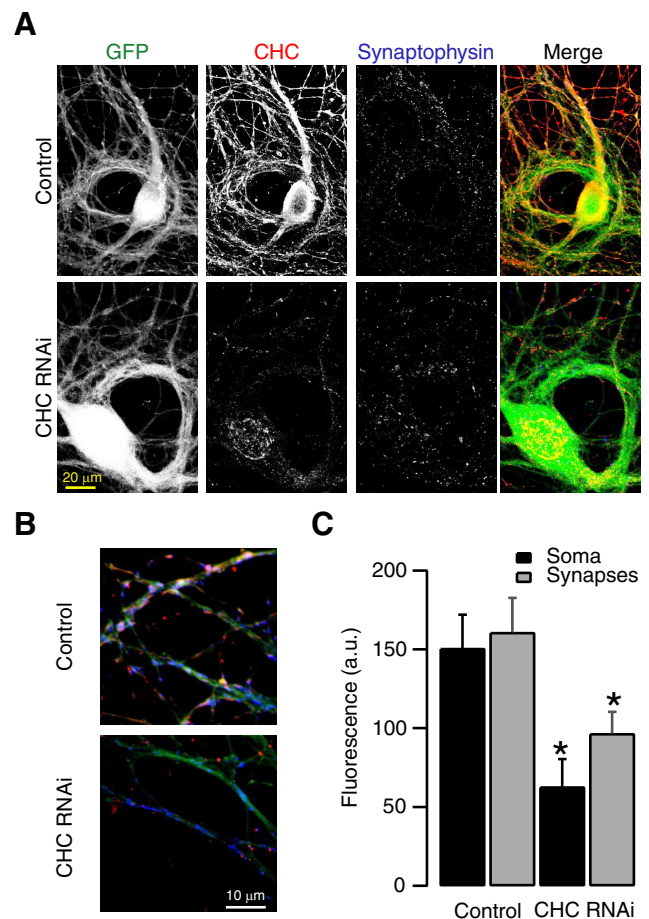
**Figure 2.** Clathrin moves out of synapses during high-frequency stimulation. **A**, Schematic drawing of the methodology used. An example of GFP-nLcCa mobility during sustained stimulation is shown at the bottom. Left, Image of two labeled puncta at rest. Middle, Changes in nLcCa fluorescence are shown by subtracting an average baseline image. Notice fluorescence moved (white) away from putative synapses (black). Right, Plot profile of changes in fluorescence at the arrowed bouton before (black) and during (blue trace) stimulation. Scale bars, 0.5 nA, 50 ms. **B**, GFP-nLcCa accumulates in synapses. Dendrites of a SCM where GFP-nLcCa is expressed in discrete puncta (arrows). Labeled structures colocalize with the presynaptic markers synaptophysin and VAMP-2. **C**, Monitoring changes in GFP-nLcCa fluorescence of putative synapses during high-frequency stimulation. Fluorescence intensity decreased during stimulus application and reverted immediately afterwards. Bar shows delivery of 3000 stimuli at 20 Hz. **D**, Left, Example of a neuron in which synapses were first identified by sequential staining and destaining of FM4–64 (arrow indicates application of a train of stimuli). A mask of the ROIs defining the position of synapses was placed over the image of cytoplasmic GFP expression. Right, GFP fluorescence did not change during the application of a train of stimuli (arrow shows onset). **E**, The decrease in GFP-nLcCa fluorescence was dependent on release probability, evidenced by changing  $[Ca^{2+}]_{ext}$  from 2 mM (black) to 4 mM (blue). The change in  $[Ca^{2+}]_{ext}$  had little effect on the initial EPSCs of the stimulus train (black arrows), but consistently evoked larger synaptic responses as depression developed (brown arrows). The change in release probability affected differentially the time course of relative changes in GFP-nLcCa fluorescence in a synapse of the recorded neuron. Although no changes were obvious during application of 600 stimuli at 20 Hz (bar) in 2 mM  $[Ca^{2+}]_{ext}$  (black), a reversible decrease in fluorescence occurred in 4 mM  $[Ca^{2+}]_{ext}$ . **F**, Average change in GFP-nLcCa fluorescence relative to the number of stimuli delivered at 20 Hz as a function of  $[Ca^{2+}]_{ext}$ . Differences between 2 mM  $[Ca^{2+}]_{ext}$  ( $n = 14$  cells) and 4 mM  $[Ca^{2+}]_{ext}$  ( $n = 13$  cells) appeared as stimulation proceeded. Traces indicate mean  $\pm$  SEM.

(Granseth et al., 2006). However, it is possible that GFP fluorescence is quenched due to a decrease in synaptic pH, because it has been shown that synaptic terminals acidify during high-frequency stimulation (Rossano et al., 2013). To test this possibility, we measured changes in cytoplasmic GFP in presynaptic terminals, identified by staining with FM4–64 and subsequent stimulus-dependent destaining (Fig. 2D). These experiments showed that the fluorescence of GFP located at synaptic boutons was not quenched during high-frequency stimulation and suggest that the decrease in GFP-nLcCa fluorescence is due solely to movement out of the synapse.

If a decrease in GFP-nLcCa fluorescence were associated with synaptic vesicle retrieval, it should depend on the extent of exocytosis. To evaluate this possibility, we next investigated the change in synaptic GFP-nLcCa fluorescence as a function of release probability, shown by increasing  $[Ca^{2+}]_{ext}$  from 2 to 4 mM. In the example shown in Figure 2E, there were no obvious changes in GFP-nLcCa fluorescence during application of 600 stimuli at 20 Hz in 2 mM  $[Ca^{2+}]_{ext}$ . However, a significant decrease occurred when  $[Ca^{2+}]_{ext}$  was changed to 4 mM. The enhancement of release probability had little effect at the beginning of the train, but had a significant contribution later (see recordings in Fig. 2E, top) as more stimuli were delivered. On average, long-lasting, high-frequency stimulation of synaptic terminals operating at a low release probability evoked a decrease in presynaptic clathrin levels of ~5% after 2000 stimuli delivered at 20 Hz (Fig. 2F). In contrast, application of the same stimulation paradigm to synapses operating at a high release probability decreased presynaptic clathrin by ~15%. Based on these results, we wondered whether the transient decrease in clathrin availability contributes to synaptic depression and, if so, how?

### Lowering clathrin levels decreases synaptic currents

To investigate whether clathrin availability constrains neurotransmission, we needed to establish a method to manipulate clathrin levels experimentally to mimic the synaptic clathrin loss observed during stimulation. To do this, we reduced the levels of CHC in SCMs using lentiviral infection that coupled shRNA production with expression of GFP. Control experiments in which neurons expressed GFP alone or GFP + GL2 shRNA showed normal clathrin levels (Fig. 3A). Putative synapses, as shown by synaptophysin staining, were positively labeled for CHC. Therefore, cytoplasmic overexpression of GFP did not interfere with clathrin localization to synapses (Fig. 3B). Delivery of CHC shRNA homogeneously reduced clathrin levels through the cytoplasm and a comparable knock down was found at soma and synapses (Fig. 3C). Due to the major role of clathrin in synaptic vesicle recycling, a possible effect of CHC knock down on synaptic vesicle proteins was evaluated. In control infections, VAMP-2 and synaptophysin appeared at a density of  $0.09 \pm 0.02$  ( $n = 6$ ) and  $0.05 \pm 0.02$  ( $n = 5$ ) puncta  $\cdot \mu m^{-2}$ , respectively. Similar densities of  $0.07 \pm 0.02$  ( $n = 9$ ) VAMP-2 and  $0.04 \pm 0.02$  ( $n = 10$ ) synaptophysin puncta  $\cdot \mu m^{-2}$  were observed after reduction of clathrin levels. Therefore, it is unlikely that the expression of CHC RNAi affects the levels of synaptic-vesicle-associated proteins. However, there were large individual variations in clathrin depletion by RNAi. Some neurons showed normal CHC levels, whereas others had almost no label. We therefore investigated each neuron individually by correlating two methods: electrophysiology and immunofluorescence microscopy (Fig. 4A). Once synaptic responses were measured in infected neurons, SCMs were micrographed, immunostained for CHC, and subsequently identified.



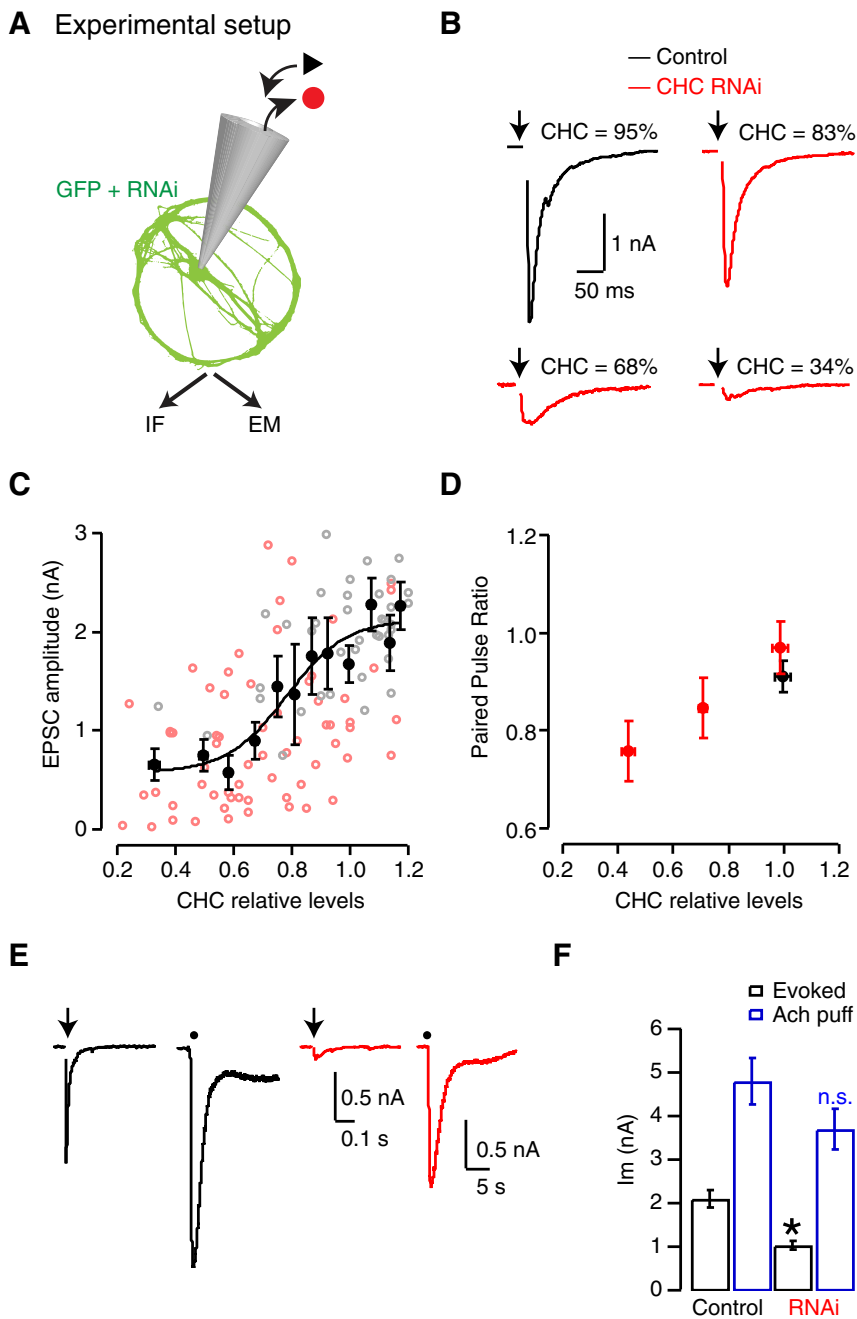
**Figure 3.** Depletion of CHC by RNAi in SCMs. **A**, Representative fluorescence micrographs showing single GFP-expressing SCMs costained for CHC (red) and synaptophysin (blue). SCMs were infected with lentiviruses to express GFP alone (control) or GFP and shRNA to deplete CHC (CHC RNAi). **B**, Expanded view of micrographs in **A** to show that clathrin was decreased at synapses after RNAi. **C**, Bar chart showing quantification of CHC levels at the cell soma or synapses (identified by synaptophysin staining). Bars indicate mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 5$ ). Asterisks denote significant differences ( $p < 0.05$ ).

The first observation was an apparent reduction in EPSCs as the clathrin concentration decreased (Fig. 4B). To investigate how synaptic responses were affected by clathrin levels, binned data from all recorded cells ( $n = 134$ ) were well described by a sigmoidal function relating EPSC amplitude and CHC levels (Fig. 4C). On average, synaptic responses transitioned from ~0.6 nA in cells with low clathrin levels to ~2 nA in cells with normal clathrin levels, displaying a  $[clathrin]_{half}$  value of 0.78. Therefore, an ~20% decrease in clathrin levels reduced the amplitude of the average EPSC by 35%. No synaptic responses were found when clathrin levels were reduced by >80%, likely reflecting the impossibility of establishing or maintaining functional neurotransmission in such conditions.

### Decreased synaptic currents in cells with lowered clathrin levels are due to a presynaptic effect

The depressed synaptic currents observed after clathrin depletion could be due to a presynaptic or postsynaptic mechanism. To distinguish these possibilities, we first evaluated presynaptic plasticity by paired-pulse stimulation. Control neurons showed a characteristic paired-pulse ratio of ~1 for a 1 s interval, as described previously (Perez-Gonzalez et al., 2008; Albrecht et al., 2012). As expected for a primarily presynaptic mechanism, knock





**Figure 4.** Synaptic transmission depends on clathrin levels. **A**, Summary of the methodology applied for this figure and subsequent work. Correlative experiments relating electrophysiological recordings and immunofluorescence (IF) or electron microscopy (EM) were performed for SCMs. **B**, The amplitude of EPSCs was correlated to CHC levels measured by IF. Example recordings from four different neurons with different clathrin levels; single sample events are shown. **C**, A sigmoid function described the relationship between the amplitude of evoked synaptic currents and CHC levels. Data were grouped in bins (dots,  $n = 10$ ). Each open circle represents mean EPSC amplitude of a single neuron. Notice the large variation from neurons in which CHC was depleted. Error bars indicate SEM. **D**, Presynaptic plasticity, evaluated as paired-pulse ratio obtained for a 1 s time interval, is related to CHC levels. **E**, Presynaptic terminals are more sensitive than postsynaptic terminals to CHC knock down. Sample recordings from a control and a knock-down neuron to compare the sensitivity of presynaptic and postsynaptic terminals with a decrease in clathrin levels. First, a postsynaptic response was evoked by a 1 ms depolarization of the presynaptic terminal (arrow). Next, a 50 ms puff of 1 mM acetylcholine was applied on top of the SCM (dot) to evoke a postsynaptic response, with no requirement of the presynaptic component. **F**, Knock down of CHC significantly decreased ( $p < 0.05$ ) the amplitude of EPSCs evoked by electrical stimulation, but did not affect responses generated by local application of acetylcholine. Control neurons,  $n = 7$ ; CHC-depleted neurons,  $n = 11$ .

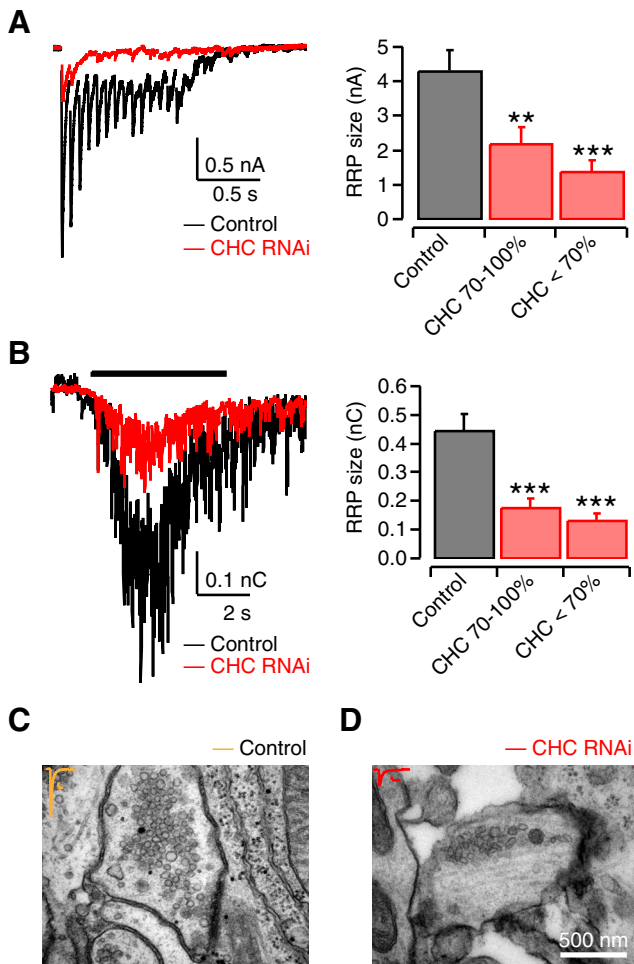
down of clathrin was associated with the paired-pulse ratio: those neurons displaying the lowest clathrin levels also showed the strongest depression, but in neurons in which clathrin depletion failed, plasticity was normal (Fig. 4D). A second line of evidence

was obtained by comparing, in the same neuron, synaptic responses evoked by single depolarization or by an acetylcholine puff. Postsynaptic responses triggered by an electrical stimulus involve the release of acetylcholine from presynaptic terminals, whereas the response to local application of neurotransmitter only requires the postsynaptic element. EPSCs generated chemically were larger than those evoked electrically (Fig. 4E), suggesting that postsynaptic receptors are not saturated by neurotransmitter release from a single AP and that local application of 1 mM acetylcholine provides a readout of the functional pool of postsynaptic nicotinic receptors present in a SCM. On average, knock down of CHC significantly reduced the amplitude of evoked EPSCs, but did not have an effect on responses generated by local delivery of acetylcholine (Fig. 4F). Together, these experiments show that the function of presynaptic terminals was particularly sensitive to CHC depletion. In contrast, postsynaptic terminal function remained largely unaffected. These results indicate that the abundance of clathrin constrains neurotransmission via a presynaptic action.

#### Lowering clathrin levels reduces the RRP of vesicles

To gain an understanding of the effects of low clathrin levels on presynaptic terminal function, we next investigated the functional organization of synaptic vesicles. It is considered that vesicles are distributed in two large pools: the RRP, which is responsible for fast vesicle release, and the cytoplasmic pool, which acts as a reservoir and is organized in several subpools (Denker and Rizzoli, 2010). Because the RRP critically determines synaptic responses and short-term plasticity, we applied two complementary methodologies to investigate the size of this vesicle pool: a 15 Hz train of stimuli and the local application of hypertonic solution to obtain low and high estimates, respectively (Albrecht et al., 2012). The first method, performing cumulative analysis of synaptic responses during sustained stimulation (Fig. 5A), showed that the release of the whole RRP in a control neuron would, on average, evoke a postsynaptic response of 4.3 nA. Considering that exocytosis of a single vesicle triggers a postsynaptic current of  $\sim 60$  pA, a lower limit for the RRP from all autapses of an average SCM would be  $\sim 70$  vesicles. The

second method (Fig. 5B) relied on the analysis of the postsynaptic response evoked by a local puff of a hypertonic solution. Because the charge carried by evoked EPSCs was 447 pC, and taking into



**Figure 5.** The size of the RRP of vesicles is highly sensitive to a decrease in clathrin levels. **A**, Representative traces estimating the size of the RRP based on the application of a train of 15 stimuli delivered at 15 Hz. Note that depression of synaptic responses was enhanced when CHC was depleted (red). Bar chart summarizing the mean  $\pm$  SEM size of the RRP.  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ . **B**, A second method to estimate the size of the RRP was based on a 5 s application of a hyperosmotic shock. Example traces and summary bar chart are shown as in **A**. **C, D**, Electron micrographs illustrating the appearance of the morphological RRP. Control synapses typically showed several vesicles docked at active zones (**C**). In contrast, CHC RNAi terminals displayed less vesicles attached to their active zones and some appeared completely devoid of vesicles (**D**). Corresponding synaptic responses for this neuron are shown on the top left corner. Scale bars, 0.2 nA, 100 ms.

account that an average mEPSC carried  $\sim 2$  pC, the RRP could thus be as high as  $\sim 220$  vesicles. Assuming that axosomatic autapses are the main contributors to synaptic responses due to dendritic filtering properties (Bekkers and Stevens, 1996), and considering that an average SCM would contain  $\sim 25$  axosomatic contacts (Albrecht et al., 2012), the RRP of a prototypical autapse would be defined by three to nine synaptic vesicles. This figure is comparable to other small conventional synapses, such as hippocampal boutons (Schikorski and Stevens, 1997).

The RRP size was very sensitive to small decreases in clathrin levels. Due to the large variability in CHC knock down, clathrin levels were classified in two groups: moderate knock down (70–100% relative to control CHC levels) and intense knock down ( $<70\%$ ). Under moderate CHC knock down, the RRP was already reduced to approximately one-half, ranging from 41 to 90 vesicles ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively), and the RRP decreased to approximately one-third under intense CHC knock

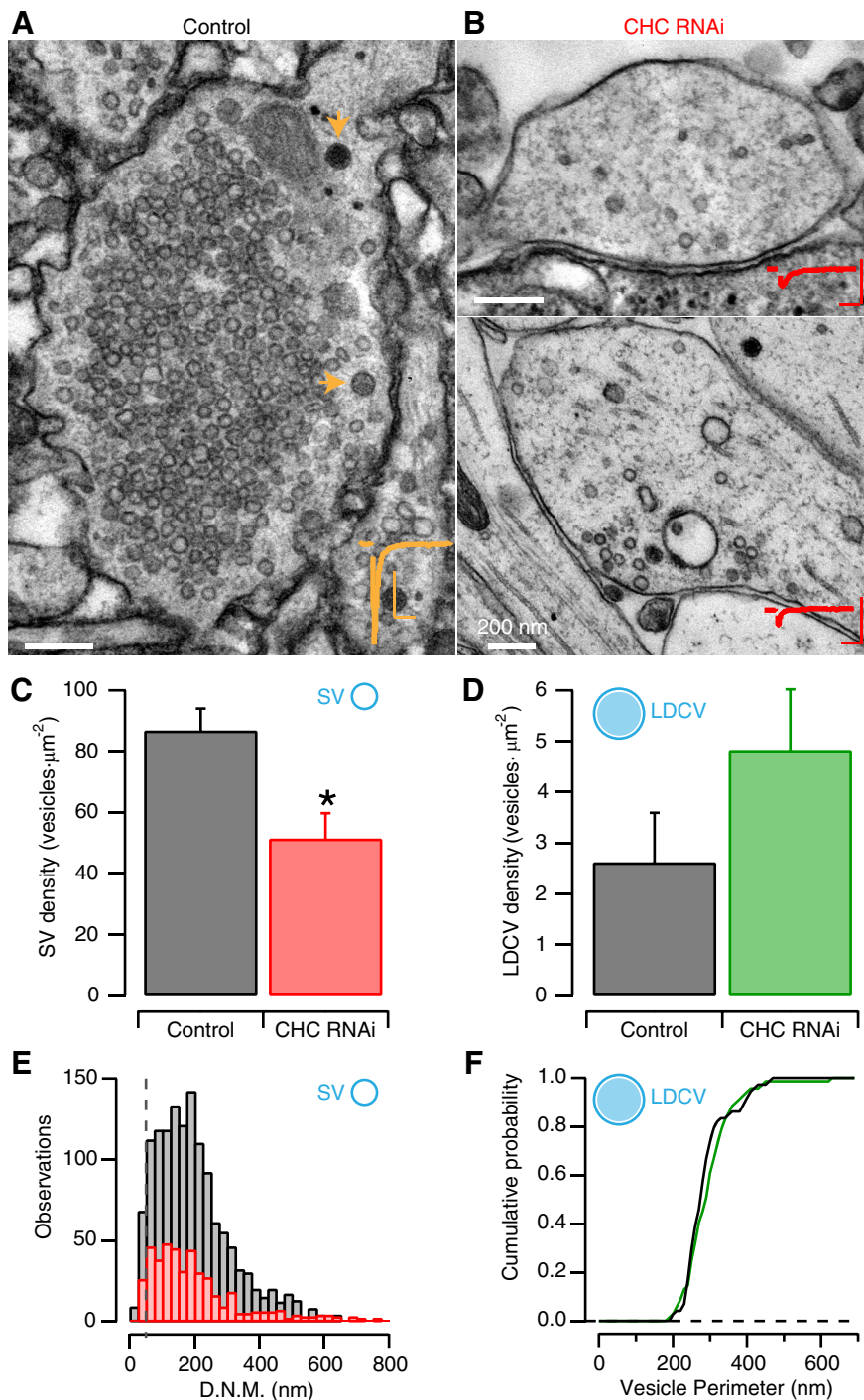
down, within a range of 22 to 67 vesicles ( $p < 0.001$ ). Because an apparently small reduction of presynaptic clathrin levels decreased RRP size by 50%, we deemed that such an effect should be obvious by morphological analysis. Assuming that the functional RRP is tightly related to the number of docked vesicles at active zones, we correlated synaptic responses to ultrastructural analysis. Three control SCMs were investigated, which had an average EPSC amplitude of 1.6 nA. For comparison, five SCMs in which clathrin levels were reduced by CHC RNAi were also studied. Because growth on Thermanox coverslips precluded doing immunofluorescence on neurons selected for electron microscopy, CHC knock down was estimated from EPSC amplitudes. Selected neurons had synaptic potencies ranging from 0.1 to 0.8 nA, so their clathrin levels were likely within the range of intense knock down (i.e.,  $<70\%$  of control levels; Fig. 4C).

Active zones found in random sections of control neurons showed a characteristic appearance (Fig. 5C). Typically, two to six synaptic vesicles were clustered in presynaptic densities indicating sites of preferential release. Under CHC knock down, presynaptic terminals consistently showed fewer docked vesicles (Fig. 5D) and some densities appeared to be devoid of synaptic vesicles. Although it would be necessary to reconstruct the entire active zone to certify a complete absence of vesicles, this observation fits to functional estimates of RRP size assuming that the number of synaptic contacts was not affected by CHC knock down. Again, considering an average of  $\sim 25$  axosomatic synapses on a prototypical SCM, an intense decrease of clathrin levels would reduce the RRP from zero to three vesicles in a single autapse. This is consistent with the ultrastructural observations shown here.

#### Lowering clathrin levels reduces the density and size of synaptic vesicles

We next evaluated synaptic vesicle populations morphologically in neurons from which we had previously recorded synaptic responses. Synaptic terminals (Fig. 6A) contained numerous cholinergic, clear vesicles that coexisted with a small proportion of large dense-core vesicles (LDCVs). Each type of vesicle has a different biogenesis: clear vesicles essentially bud from endosomes and LDCVs are sorted in the trans-Golgi network and transported to synaptic terminals (Bonanomi et al., 2006; Zhang et al., 2010). We found that each type of vesicle had a different sensitivity to manipulation of clathrin levels. There was an obvious reduction in the density of clear vesicles ( $p < 0.05$ ) in all CHC RNAi synapses studied, as shown in the examples of axosomatic and axodendritic contacts (Fig. 6B). Two factors contributed to this decrease (Fig. 6C). First, there was a reduction from  $60 \pm 9$  vesicles in control autapses ( $n = 27$ ) to  $25 \pm 4$  vesicles ( $n = 21$ ) in knock-down boutons. Second, there was an increase in terminal area after CHC RNAi from  $0.68 \pm 9$  to  $0.90 \pm 0.13 \mu\text{m}^2$ . However, the increase in presynaptic surface did not affect the density of LDCVs, which remained unaltered after CHC depletion (Fig. 6D).

Further analysis addressed the overall distribution of synaptic vesicles throughout the cytoplasm. Measurement of distance to the nearest portion of plasma membrane provided a readout of vesicle position relative to putative release sites. Distance of vesicles to the plasma membrane was similar in control and low clathrin levels (Fig. 6E). For example, the proportion of vesicles within 50 nm from the presynaptic membrane, which were considered docked, was 5.6% ( $n = 1366$ ) and 7% ( $n = 728$ ) in control and CHC RNAi conditions, respectively. No differences were observed in the distance of LDCVs to the plasma membrane.



**Figure 6.** Effect of CHC knock down on clear and LDCVs. **A**, Electron micrograph of an axosomatic presynaptic terminal from a control neuron. Corresponding EPSC from this neuron is shown in orange. The cytoplasm is filled with clear synaptic vesicles, and a few LDCVs are observed (arrows). Scale bars, 1 nA, 100 ms. **B**, Micrographs of axosomatic (top) and axodendritic (bottom) synapses from two different neurons in which CHC was depleted. The associated synaptic responses are shown in red. Scale bars, 1 nA, 100 ms. **C**, **D**, Bar chart showing the average density of clear synaptic vesicles (**C**) and LDCVs (**D**) in control and CHC RNAi presynaptic terminals. Mean  $\pm$  SEM is shown.  $*p < 0.05$ . **E**, The cytoplasmic distribution of clear synaptic vesicles was not affected by CHC knock down. Dotted line indicates distance to nearest membrane (D.N.M.) of 50 nm or docked vesicles. **F**, Cumulative distribution of LDCV size showing that a decrease in clathrin levels did not change the perimeter of this type of vesicle.

Therefore, there was a proportional reduction of synaptic vesicles without apparently affecting their distribution in low clathrin levels. This finding suggests equilibrium between cytoplasmic pools and the RRP (see Discussion).

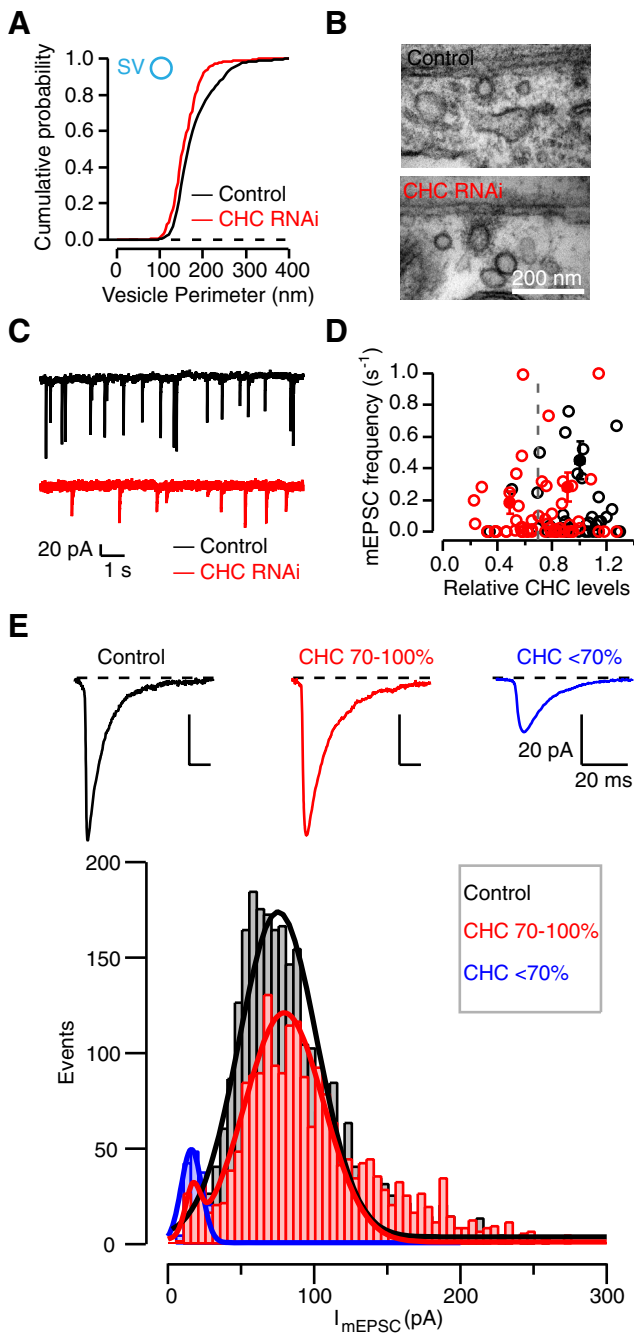
A striking finding was that clear synaptic vesicles were smaller when clathrin levels were reduced. This was in contrast to LDCVs, the size of which was not affected (Fig. 6F). The distribution of vesicle sizes under CHC knock down was left shifted with respect to controls (Fig. 7A). A potential explanation for this observation was that, after CHC knock down, CME was not operative and vesicles were being reformed by alternative mechanisms. This possibility was minimized, because clathrin-coated structures forming at the plasma membrane were observed both in normal and low clathrin levels (Fig. 7B), suggesting that, under conditions of reduced clathrin, the synaptic vesicles that reform are abnormal.

On average, the diameter of clear synaptic vesicles was reduced by  $\sim 5$ – $8$  nm in low clathrin levels, similarly to a previous finding in *C. elegans* with a temperature-sensitive mutant of CHC (Sato et al., 2009). Such a decrease could potentially affect neurotransmission, because changing the mean vesicle diameter from 53 to 48 nm would reduce the potential volume to store neurotransmitter by  $\sim 25\%$ . In summary, the overall reduction of synaptic vesicle pools (Figs. 5, 6) and vesicle size (Fig. 7A) observed by CHC RNAi demonstrates a high sensitivity of clear vesicles to changes in clathrin levels.

#### Knock down of CHC reduces quantal size

The possible functional implications of a reduction in synaptic vesicle density and size after CHC knock down were further investigated by analyzing spontaneous synaptic activity. On average,  $0.44 \pm 0.1$  mEPSCs  $s^{-1}$  were observed in control SCMs (Fig. 7C). Knock down of CHC reduced the frequency of spontaneous events, albeit with large variability among control cells that precluded observing significant differences. When clathrin levels were moderately reduced, between 70% and 100% of wild-type levels, mEPSCs were observed at a frequency of  $0.28 \pm 0.1$   $s^{-1}$  (Fig. 7D). For clathrin levels  $< 70\%$  of control conditions, mEPSCs appeared at  $0.18 \pm 0.1$   $s^{-1}$ . Such a reduction could be attributed to the overall decrease in synaptic vesicles, which was observed by electron microscopy (Fig. 6A–C). However, mEPSC amplitude was also affected by CHC knock down (Fig. 7E). Quantal size of control mEPSCs was well described by a

single Gaussian fit with a mean value of 72 pA. An intense reduction of clathrin levels  $< 70\%$  of wild-type values generated a new population of events that were, again, well distributed by a single Gaussian fit to a mean amplitude of 14 pA. Both populations were



**Figure 7.** Knock down of CHC reduces the size of clear synaptic vesicles and decreases the amplitude of miniature spontaneous events. **A**, Cumulative distribution of the perimeter of clear synaptic vesicles. Knock down of CHC left shifted the size of this vesicle type. On average, the diameter of clear vesicles was 5–8 nm smaller when clathrin levels were reduced. **B**, Electron micrographs showing CCVs attached to the plasma membrane occurred at synapses in cells with control or low clathrin levels. **C**, Sample recordings of spontaneous activity in control (black) and CHC knock-down conditions. **D**, The frequency of mEPSCs was reduced when clathrin levels were decreased. Open circles indicate the average mEPSC frequency for individual control (black) or knock-down (red) neurons. Black dot shows mean  $\pm$  SEM of all control experiments. Dashed line indicates the criterion for grouping knock-down neurons in two sets (red dots, mean  $\pm$  SEM) as a function of relative CHC content: cells with 70–100% control CHC levels (moderate knock down) and cells  $<$ 70% (intense knock down). **E**, Effect of CHC depletion on quantal size. Top examples indicate the average mEPSC for three different neurons in control conditions (black) and after moderate (red) or intense (blue) CHC knock down. The amplitude distribution of mEPSCs obtained in control neurons and after intense CHC knock down was well fitted by a single Gaussian with mean values of 72 and 14 pA, respectively. In contrast, the distribution of mEPSC amplitudes for a moderate CHC knock down was fitted by two Gaussians, with similar mean amplitudes to control and intense knock-down populations.

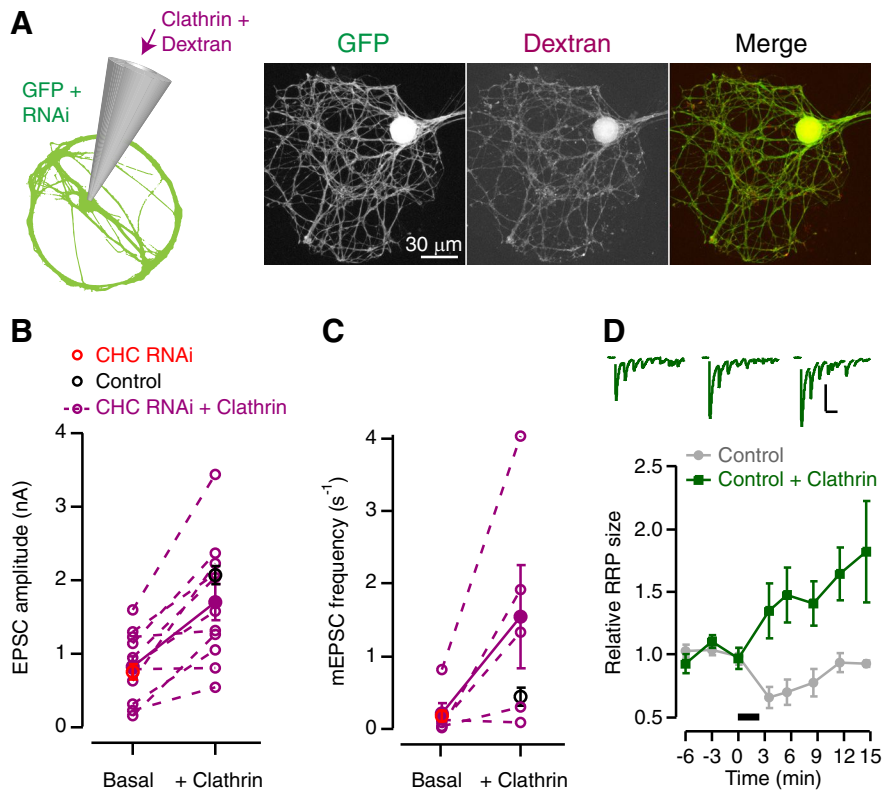
obvious when clathrin levels were moderately decreased. Under this condition, most mEPSCs fell within the control population, but  $\sim$ 8% of the events were found within the group of low quantal size. An intense reduction in clathrin levels was thus required to consistently modify quantal size. This observation contrasts with the high sensitivity of the RRP to moderate changes in clathrin levels, as described previously (Fig. 5).

A consistent shrinkage of 5–8 nm in vesicle diameter would decrease the available vesicle volume to store acetylcholine between  $\sim$ 25% and  $\sim$ 30%. However, analysis of mEPSCs indicates that, in cells with low clathrin levels, the quantal size was actually reduced by 80%. It is thus likely that, in addition to the reduction in vesicle volume, lowering CHC levels alters the composition of synaptic vesicles. Inadequate retrieval of specific cargo such as vesicular ACh transporters or proton pumps that may lead to impaired loading of neurotransmitter could explain the additional reduction in quantal size beyond that predicted by morphological data.

### Reversibility of clathrin depletion effects by dialysis of exogenous clathrin

Our experimental approach, using RNAi to mimic the physiological reduction in clathrin availability, has the drawback that the effects seen may be due solely to lowering clathrin levels and may be due in part to an off-target effect of RNAi. We set out to “rescue” the RNAi phenotype by dialyzing purified clathrin into the cell (Fig. 8A). This allowed us to test the reversibility of the described presynaptic changes after CHC knock down in the same neuron by recording after breaking in whole-cell configuration and again after 15–20 min of dialysis with exogenous clathrin. Two specific effects of CHC depletion reverted after dialysis. First, the amplitude of EPSCs increased (cf. Figs. 8B, 4C). In 63% of the neurons studied ( $n = 11$ ), the size of EPSCs was at least doubled and, on average, synaptic responses increased by a factor of 2.6. We confirmed that this change in EPSC amplitude was due to a presynaptic increase in clathrin availability rather than a postsynaptic effect because responses to local puffs of 1 mM ACh did not change before and after clathrin dialysis ( $n = 4$ ). Second, the frequency of spontaneous events increased from  $0.22 \pm 0.1$  to  $1.54 \pm 0.7$  ( $n = 5$ ; cf. Figs. 8C, 7D). Infusion of exogenous clathrin did not induce the appearance of mEPSCs in neurons without spontaneous activity. Contrary to mEPSC frequency, quantal size was, on average, unaltered. The amplitude of mEPSCs did not change, being  $42 \pm 1$  pA ( $n = 427$ ) before and  $41 \pm 1$  pA ( $n = 919$ ) after 20 min of dialysis with exogenous clathrin.

Together, our results suggest that presynaptic clathrin levels are a limiting factor for presynaptic function. The ability to dialyze clathrin allowed us to test this idea directly. We repeated the experimental paradigm in Figure 1D supplementing control cells with exogenous clathrin to test whether physiological clathrin depletion was participating in the depression of synaptic responses after high-frequency stimulation. RRP size was no longer affected by the application of 3000 stimuli delivered at 20 Hz (Fig. 8D). An overall enhancement of neurotransmitter release probability was obvious as dialysis time increased, such that there was an almost twofold increase in the RRP size 20 min after breaking into whole-cell configuration. In contrast, changes in quantal size after high-frequency stimulation (Fig. 1B, C) were difficult to interpret. Clathrin dialysis gradually widened the distribution of mEPSC amplitudes; however, the low spontaneous activity of SCMs precluded a detailed population analysis. Our results suggest that continuous supplementation of presynaptic



**Figure 8.** Reversibility of clathrin depletion phenotype by dialysis of exogenous clathrin. **A**, Summary of the methodology applied. Internal solution was supplemented with 0.25 mM purified rat clathrin and 0.2 mM Texas red/3 kDa dextran. Successful dialysis was verified by visualizing the neuritic tree of GFP-expressing neurons (representative micrographs are shown). **B**, The decrease in EPSC amplitude caused by RNAi-mediated clathrin depletion reverted after 15–20 min dialysis of exogenous clathrin. Broken lines show the change in EPSC amplitude for individual neurons. Notice that, on average, the infusion of exogenous clathrin allowed neurons to recover control synaptic potency (compare dots with red and black circles, all indicating mean  $\pm$  SEM). **C**, Same as **B** but showing the effect of clathrin dialysis on the frequency of spontaneous events. **D**, Infusion of exogenous clathrin in control cells (green) protected against the decrease in the RRP induced by sustained high-frequency stimulation. Control data (gray) are from Figure 1D. Bar indicates application of 3000 stimuli at 20 Hz. Scale bars, 1 nA, 100 ms.

clathrin levels increases variability in the composition and/or size of synaptic vesicles reformed by endocytosis.

## Discussion

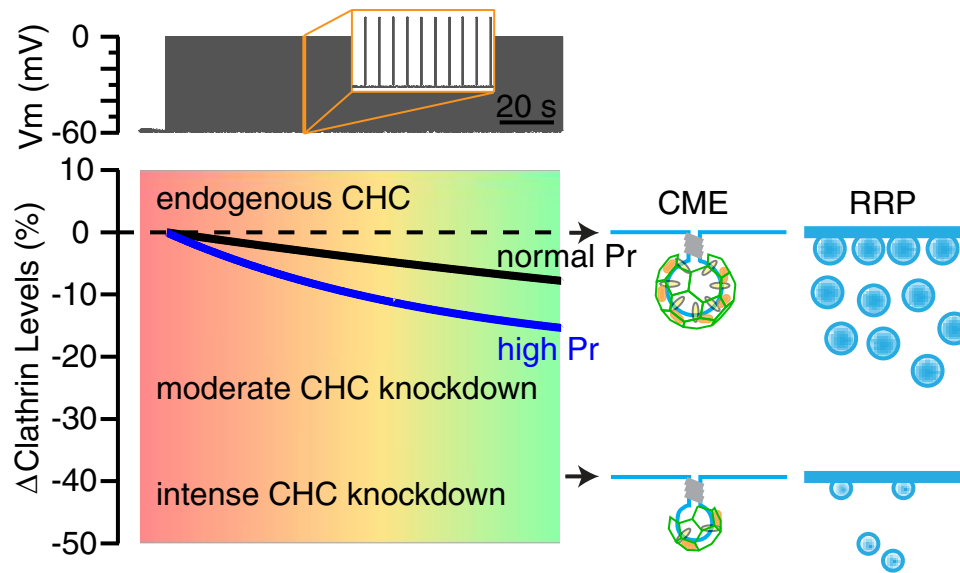
The present study tested whether clathrin levels are a limiting factor for synaptic function. Our results showed that synaptic clathrin availability is not constant and decreases during periods of neuronal activity as a function of stimulus strength and presynaptic release probability. Synaptic responses are related to clathrin levels by a sigmoid function, such that clathrin decreases of >20% significantly reduce synaptic strength. Beyond this threshold, terminals become particularly sensitive and the organization of synaptic vesicle pools, vesicle size, and quantal content are all decreased. These findings indicate that presynaptic clathrin levels are a dynamic property that contributes to plasticity when synapses are subjected to sustained physiological stimulation (Fig. 9).

Lateral movement of synaptic proteins after exocytosis is restricted to the periaxial zone, where clathrin coat formation initiates (Heuser and Reese, 1973; Shupliakov et al., 1997). As CME proceeds with a time constant of  $\sim$ 15 s (Wu et al., 2007), exocytosis and endocytosis are balanced at low-frequency stimulations. However, during sustained stimulation, the exocytic load overcomes endocytic capacity. This results in an excess of synaptic vesicle proteins incorporated to the plasma membrane that

move far from active zones (Saheki and De Camilli, 2012). In hippocampal boutons, synaptic cargo laterally diffusing in the plasma membrane is tracked by clathrin (Granseth et al., 2006). Similarly, our results in cholinergic autapses suggest that clathrin moves out of synapses upon stimulation. Movement is reversible and dependent on release probability, so the amount of clathrin available at synapses is not fixed and transiently decreases upon stimulation. We estimate that delivery of 2000 stimuli at 20 Hz causes between  $\sim$ 5% and  $\sim$ 15% of total clathrin to move out of the terminal depending on whether synapses operate at normal or high release probability. However, movement of clathrin out of synapses would only define a lower limit to the actual decrease of clathrin levels. The formation of clathrin coats themselves, or the capacity of synaptic vesicles to act as a clathrin buffer, further decreases the ACP (Denker et al., 2011). Altogether, the combination of our results and previous work, suggest that synapses—especially those operating at a high release probability—are likely to undergo a transient clathrin “knock down” when subjected to intense stimulation. Two pieces of experimental evidence reinforce this possibility. First, the addition of exogenous clathrin prevents depletion of the RRP of vesicles after high-frequency stimulation (Fig. 8D). Second, transient decreases in clathrin levels obtained by CHC knock down mirror synaptic depression features observed after sustained stimulation (Figs. 4, 5, 7). So the question is, to what extent does clathrin availability

influence presynaptic function? In absolute terms, a 20% decrease in clathrin levels is expected to be on the order of 10–100  $\mu$ M. This estimate can be obtained from recovery experiments. Considering axonal tortuosity, the high diffusion coefficient of clathrin (Nandi and Wahl, 1988), and the fact that half of endogenous clathrin remained after depletion, presynaptic [clathrin] is unlikely to be  $>0.1$ – $0.2$  mM. In any case, such a moderate decrease in clathrin levels would be the threshold value for presynaptic terminals to acquire a depressed phenotype. However, two considerations should be taken into account: (1) our results based on RNAi take place in the timescale of days, and (2) all presynaptic changes are only occurring together when clathrin levels are intensely reduced. By just crossing the 20% threshold, only synaptic strength and RRP size are affected.

The first consideration can be addressed by comparison to previous works, such as those making a genetic acute effect on endocytosis using shibire flies. When these flies are driven to nonpermissive temperature, synaptic transmission is immediately impaired, caused by the arrest of clathrin-coated pits at the plasma membrane after block of dynamin-mediated endocytosis (Koenig and Ikeda, 1989). Interestingly, continuous stimulation of neuromuscular junctions in these mutant flies at nonpermissive temperature generates a similar phenotype to the described CHC knock-down effects: synaptic strength and RRP size gradu-



**Figure 9.** Summary model of the contribution of presynaptic levels to synaptic depression. In synapses with low levels of clathrin, the quality of vesicles that are retrieved is inferior compared with vesicles retrieved in conditions of normal clathrin abundance. The vesicles are smaller and carry less neurotransmitter and the pools of vesicles are also reduced. We found that application of a sustained, high-frequency stimulation triggers the movement of clathrin out of presynaptic terminals, reducing presynaptic clathrin levels. Examples shown are average traces from normal ( $2 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_{\text{extr}}$ , black) or high ( $4 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_{\text{extr}}$ , blue) neurotransmitter release probability conditions. This implies that the fidelity of vesicle reformation decreases during stimulation such that the final few vesicles to be retrieved convey less information than those retrieved at the beginning of activity. This compromise in synaptic transmission contributes to synaptic depression.

ally decrease (Li and Schwarz, 1999). Similar observations are obtained after FAsH-FALI-mediated protein photoinactivation of clathrin light chain (Heerssen et al., 2008). These acute effects are best explained if the RRP and cytoplasmic pool of vesicles are in equilibrium, suggesting endocytosis as a direct determinant of synaptic transmission by maintaining the size of synaptic vesicle pools. This view is also supported by synaptophysin-pHluorin imaging of hippocampal boutons, which shows that CME is key to synaptic strength (Granseth and Lagnado, 2008). However, an alternative role for clathrin can be proposed from the acute action of two endocytosis inhibitors on synaptic release of hippocampal boutons (Hua et al., 2013). These experiments reveal that CME is involved in the clearance of vesicular debris at the active zone during high-frequency stimulation, which appears to be an important determinant of short-term depression. Whether CME is required to maintain synaptic vesicle pools or is necessary for a correct function of active zones during sustained stimulation, both mechanisms support a pivotal role of clathrin. In this scenario, even an apparently minor decrease in presynaptic clathrin levels would lead to a reduction in synaptic strength and could be potentially implicated in the generation of short-term depression.

The second consideration can be addressed when stimulation conditions proceed to a more marked decrease in presynaptic clathrin levels (i.e.,  $<30\%$ ). In this situation, a reduction in quantal size would also contribute to short-term depression. The effect is specific for clear synaptic vesicles, showing that clathrin is essentially dispensable for LDCV biogenesis. This finding is not surprising because LDCVs are sorted in the trans-Golgi network and transported to axon terminals, whereas clear SVs recycle via presynaptic endosomes and contain proteins with numerous clathrin motifs (Edwards, 2007; Jung and Haucke, 2007). A possible cause of the decrease in quantal size is defective CME, as suggested by the presence of smaller vesicles in low clathrin levels. Clathrin-coated intermediates were obvious in knock-

down conditions, suggesting reduced clathrin availability as a putative cause affecting the fidelity of CME. Lower levels of available clathrin triskelia would have an effect on all reactions involving CME (Rizzoli, 2014), probably favoring the smallest cage geometries. As a result, smaller vesicles would be formed (Cheng et al., 2007), likely with an altered composition. For example, the expected copies of vesicle-associated proteins (Takamori et al., 2006) would be reduced, which could contribute to a decrease in quantal size. These phenomena will affect vesicles being retrieved at the plasma membrane, but also those vesicles formed from bulk endocytosis, which invaginates large regions of plasma membrane, creating bulk endosomes from which synaptic vesicles can bud (Cousin, 2009).

This view should, however, be reconciled with results obtained after acute application of clathrin, which rescued evoked neurotransmission and increased mEPSC frequency but did not lead to an increase of quantal size. This raises the possibility that clathrin required a longer time period to recover this particular aspect of the depleted phenotype or that the effect on quantal size was due to an off-target effect of RNAi. Overall, our experiments dialyzing clathrin into SCMs to cause the rescue of clathrin depletion or enhanced function in control conditions suggest that clathrin levels define a limit for presynaptic function. This also implies that other endocytic proteins, e.g. stonin 2 (Willox and Royle, 2012) are amply abundant. The stoichiometry of clathrin to adaptors in a CCV is  $\sim 3:1$  (Borner et al., 2012), so adaptor supply would be unlikely to become an issue even under intense activity.

In conclusion, our results establish clathrin levels as a dynamic property of presynaptic terminals, meaning that the availability of clathrin for vesicle retrieval is key to high-fidelity neurotransmission and is implicated directly in short-term synaptic depression.

## References

- Albrecht D, López-Murcia FJ, Pérez-González AP, Lichtner G, Solsona C, Llobet A (2012) SPARC prevents maturation of cholinergic presynaptic terminals. *Mol Cell Neurosci* 49:364–374. [CrossRef Medline](#)
- Balaji J, Ryan TA (2007) Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20576–20581. [CrossRef Medline](#)
- Bekkers JM, Stevens CF (1996) Cable properties of cultured hippocampal neurons determined from sucrose-evoked miniature EPSCs. *J Neurophysiol* 75:1250–1255. [Medline](#)
- Bonanomi D, Benfenati F, Valtorta F (2006) Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle. *Prog Neurobiol* 80:177–217. [CrossRef Medline](#)
- Borner GH, Antrobus R, Hirst J, Bhumbra GS, Kozik P, Jackson LP, Sahlender DA, Robinson MS (2012) Multivariate proteomic profiling identifies novel accessory proteins of coated vesicles. *J Cell Biol* 197:141–160. [CrossRef Medline](#)
- Campbell C, Squicciarini J, Shia M, Pilch PF, Fine RE (1984) Identification of a protein kinase as an intrinsic component of rat liver coated vesicles. *Biochemistry* 23:4420–4426. [CrossRef Medline](#)
- Cheng Y, Boll W, Kirchhausen T, Harrison SC, Walz T (2007) Cryo-electron tomography of clathrin-coated vesicles: structural implications for coat assembly. *J Mol Biol* 365:892–899. [CrossRef Medline](#)
- Cousin MA (2009) Activity-dependent bulk synaptic vesicle endocytosis—a fast, high capacity membrane retrieval mechanism. *Mol Neurobiol* 39:185–189. [CrossRef Medline](#)
- Denker A, Rizzoli SO (2010) Synaptic vesicle pools: an update. *Front Synaptic Neurosci* 2:135. [CrossRef Medline](#)
- Denker A, Kröhnert K, Bückers J, Neher E, Rizzoli SO (2011) The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:17183–17188. [CrossRef Medline](#)
- Doxsey SJ, Brodsky FM, Blank GS, Helenius A (1987) Inhibition of endocytosis by anti-clathrin antibodies. *Cell* 50:453–463. [CrossRef Medline](#)
- Edwards RH (2007) The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* 55:835–858. [CrossRef Medline](#)
- Fernández-Alfonso T, Kwan R, Ryan TA (2006) Synaptic vesicles interchange their membrane proteins with a large surface reservoir during recycling. *Neuron* 51:179–186. [CrossRef Medline](#)
- Furshpan EJ, Landis SC, Matsumoto SG, Potter DD (1986) Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. I. Secretion of norepinephrine and acetylcholine. *J Neurosci* 6:1061–1079. [Medline](#)
- Goud B, Huet C, Louvard D (1985) Assembled and unassembled pools of clathrin: a quantitative study using an enzyme immunoassay. *J Cell Biol* 100:521–527. [CrossRef Medline](#)
- Granseth B, Lagnado L (2008) The role of endocytosis in regulating the strength of hippocampal synapses. *J Physiol* 586:5969–5982. [CrossRef Medline](#)
- Granseth B, Odermatt B, Royle SJ, Lagnado L (2006) Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron* 51:773–786. [CrossRef Medline](#)
- Heerssen H, Fetter RD, Davis GW (2008) Clathrin dependence of synaptic vesicle formation at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Curr Biol* 18:401–409. [CrossRef Medline](#)
- Heuser JE, Reese TS (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57:315–344. [CrossRef Medline](#)
- Hua Y, Woehler A, Kahms M, Haucke V, Neher E, Klingauf J (2013) Blocking endocytosis enhances short-term synaptic depression under conditions of normal availability of vesicles. *Neuron* 80:343–349. [CrossRef Medline](#)
- Jung N, Haucke V (2007) Clathrin-mediated endocytosis at synapses. *Traffic* 8:1129–1136. [CrossRef Medline](#)
- Kaur S, Fielding AB, Gassner G, Carter NJ, Royle SJ (2014) An unmet actin requirement explains the mitotic inhibition of clathrin-mediated endocytosis. *Elife* 3:e00829. [CrossRef Medline](#)
- Koenig JH, Ikeda K (1989) Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockade of membrane retrieval. *J Neurosci* 9:3844–3860. [Medline](#)
- Li J, Schwarz TL (1999) Genetic evidence for an equilibrium between docked and undocked vesicles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:299–306. [CrossRef Medline](#)
- Li Z, Burrone J, Tyler WJ, Hartman KN, Albeanu DF, Murthy VN (2005) Synaptic vesicle recycling studied in transgenic mice expressing synaptophysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6131–6136. [CrossRef Medline](#)
- Miller TM, Heuser JE (1984) Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 98:685–698. [CrossRef Medline](#)
- Moskowitz HS, Yokoyama CT, Ryan TA (2005) Highly cooperative control of endocytosis by clathrin. *Mol Biol Cell* 16:1769–1776. [CrossRef Medline](#)
- Nandi P, Wahl P (1988) Diffusion properties of clathrin on the surface of isolated mouse liver nuclei by the fluorescence recovery after photobleaching technique. *Biochim Biophys Acta* 943:367–370. [CrossRef Medline](#)
- Naves LA, Van der Kloot W (2001) Repetitive nerve stimulation decreases the acetylcholine content of quanta at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 532:637–647. [CrossRef Medline](#)
- Pearse BM (1976) Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1255–1259. [CrossRef Medline](#)
- Perez-Gonzalez AP, Albrecht D, Blasi J, Llobet A (2008) Schwann cells modulate short-term plasticity of cholinergic autaptic synapses. *J Physiol* 586:4675–4691. [CrossRef Medline](#)
- Rizzoli SO (2014) Synaptic vesicle recycling: steps and principles. *EMBO J* 33:788–822. [CrossRef Medline](#)
- Rizzoli SO, Betz WJ (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6:57–69. [CrossRef Medline](#)
- Rossano AJ, Chouhan AK, Macleod GT (2013) Genetically encoded pH-indicators reveal activity-dependent cytosolic acidification of *Drosophila* motor nerve termini in vivo. *J Physiol* 591:1691–1706. [CrossRef Medline](#)
- Royle SJ, Bright NA, Lagnado L (2005) Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature* 434:1152–1157. [CrossRef Medline](#)
- Saheki Y, De Camilli P (2012) Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a005645. [CrossRef Medline](#)
- Sakaba T, Schneggenburger R, Neher E (2002) Estimation of quantal parameters at the calyx of Held synapse. *Neurosci Res* 44:343–356. [CrossRef Medline](#)
- Sato K, Ernstrom GG, Watanabe S, Weimer RM, Chen CH, Sato M, Siddiqui A, Jorgensen EM, Grant BD (2009) Differential requirements for clathrin in receptor-mediated endocytosis and maintenance of synaptic vesicle pools. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1139–1144. [CrossRef Medline](#)
- Schikorski T, Stevens CF (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 17:5858–5867. [Medline](#)
- Shupliakov O, Löw P, Grabs D, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De Camilli P, Brodin L (1997) Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* 276:259–263. [CrossRef Medline](#)
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, et al. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831–846. [CrossRef Medline](#)
- Willox AK, Royle SJ (2012) Stonin 2 is a major adaptor protein for clathrin-mediated synaptic vesicle retrieval. *Curr Biol* 22:1435–1439. [CrossRef Medline](#)
- Wu LG, Betz WJ (1998) Kinetics of synaptic depression and vesicle recycling after tetanic stimulation of frog motor nerve terminals. *Biophys J* 74:3003–3009. [CrossRef Medline](#)
- Wu LG, Ryan TA, Lagnado L (2007) Modes of vesicle retrieval at ribbon synapses, calyx-type synapses, and small central synapses. *J Neurosci* 27:11793–11802. [CrossRef Medline](#)
- Zhang X, Bao L, Ma GQ (2010) Sorting of neuropeptides and neuropeptide receptors into secretory pathways. *Prog Neurobiol* 90:276–283. [CrossRef Medline](#)

# SPARC triggers a cell-autonomous program of synapse elimination

Francisco J. López-Murcia, Beatrice Terni and Artur Llobet\*

Laboratory of Neurobiology, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona and Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

**Elimination of the excess of synaptic contacts established in the early stages of neuronal development is required for refining the function of neuronal circuits. Here we investigate whether SPARC, a molecule secreted by glia, is involved in synapse removal. SPARC production peaks when innervation of the rat superior cervical ganglion and the tail of *Xenopus tropicalis* tadpoles is remodeled. Formation of new cholinergic synapses in autaptic single cell microcultures is inhibited by SPARC. The effect resides on the EC domain, which is also responsible for triggering a concentration and time dependent disassembly of stable cholinergic synapses. The loss of synaptic contacts is associated to the formation of retracted axon terminals, containing multivesicular bodies and secondary lysosomes. The biological relevance of *in vitro* results is supported by injecting the tail of *Xenopus tropicalis* tadpoles with peptide 4.2, a 20 amino acid sequence derived from SPARC that mimics full-length protein effects. Swimming is severely impaired ~5 hours after peptide application, caused by the massive elimination of neuromuscular junctions and pruning of thin axonal branches. Effects revert 3 to 6 days after injection, as cholinergic innervation re-forms. In conclusion, SPARC triggers a cell-autonomous program of synapse elimination in cholinergic neurons that likely occurs when protein production peaks during normal development.**

presynaptic terminal | synapse elimination | SPARC | neuron-glia interaction | *Xenopus tropicalis*

## INTRODUCTION

Synapse elimination is a fundamental process required for refining the function of neuronal circuits. Although the molecular mechanisms involved are largely unknown, several lines of evidence support a prominent role for glial cells. Glia engulf synaptic debris in the *Drosophila* mushroom body during metamorphosis (1) and astrocytes, microglia or terminal Schwann cell phagocytose retracted axon bulbs (2-5). However, it is unclear whether glial cells only mediate the last step of synapse remodelling, which requires phagocytosis or, in contrast, can also participate in synaptic disassembly and subsequent axon retraction. Some pathways involved in synapse elimination are the classical complement cascade (6, 7), or an increase of lysosomal activity (8) but the definition of a specific trigger remains elusive.

Since glial secreted molecules, such as thrombospondin, hevin or glypicans favour the establishment of synaptic contacts in the initial stages of synaptogenesis (9-11), we considered the possibility that a similar molecule participated in the initiation of synapse elimination. Our candidate was Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC), a matricellular protein released by astrocytes, microglia and Schwann cells. SPARC production peaks during the assembly of neuronal circuits (12) and might be involved in various developmental processes of the nervous system, such as angiogenesis, neurogenesis and neuronal migration. Three different works suggest SPARC plays a specific role in synaptic development because: *i*) prevents recruitment of GluA1 and GluA2 AMPA receptor subunits (13), *ii*) antagonizes the synaptogenic action of hevin (10), and *iii*) arrests cholinergic presynaptic terminals to an immature stage (14). All these

evidences together set SPARC as an inhibitory cue of synapse development.

Based on its high degree of conservation among vertebrates, we investigate the role of SPARC on synapse elimination in two vertebrate structures: the rat superior cervical ganglion and the tail of *Xenopus tropicalis* larvae. In both experimental systems SPARC production is maximal over the period cholinergic innervation is refined. Using single cell microcultures (SCMs), which allow investigating cholinergic synapses *in vitro* in the absence of glia (15), we show SPARC triggers an acute, concentration dependent retraction of mature axon terminals. The effect of SPARC on synapse disassembly is further supported by the ability of a SPARC derived peptide to promote transient elimination of neuromuscular junctions in the tail of living tadpoles.

## RESULTS

### Maximal SPARC production is associated to periods of cholinergic synapse elimination

SPARC secretion by glial cells varies during embryonic and postnatal life (12). However, the relationship between changes in SPARC levels and synaptic development remains an open question. We investigated protein production in the rat superior cervical ganglion, where peripheral glial cells produce high levels of SPARC that accumulate around cholinergic synapses (Fig. 1A). Low protein amounts were secreted immediately after birth, when ganglionic innervation is maximal (16). As development proceeded, SPARC levels increased, reaching a peak between one to three weeks of postnatal life (Fig. 1B, Suppl. Fig. 1). This time window coincided with the period of ganglionic synapse elimination reported for rats (17) and hamsters (18). SPARC

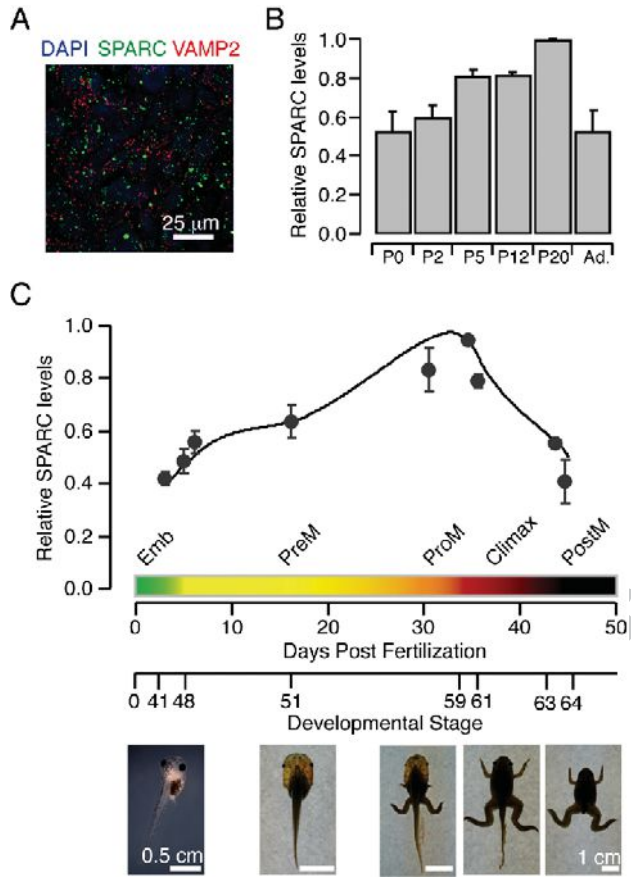
### Significance

**Neuronal circuits require eliminating the excess of synaptic connectivity to acquire complete functionality. Here we show that SPARC, a molecule exclusively secreted by glia, is a trigger for synapse elimination. SPARC, acting through a region located in its C-terminal domain, activates synapse disassembly and formation of retracted axon terminals in cholinergic neurons *in vitro*. The onset of this cell-autonomous program in the tail of living tadpoles drives to a loss of cholinergic innervation, causing transient paralysis. Besides the well established role of glial cells ending the process of synapse elimination by engulfing retracted terminals, we propose that glia can also act as a trigger through release of specific molecules, such as SPARC.**

### Reserved for Publication Footnotes



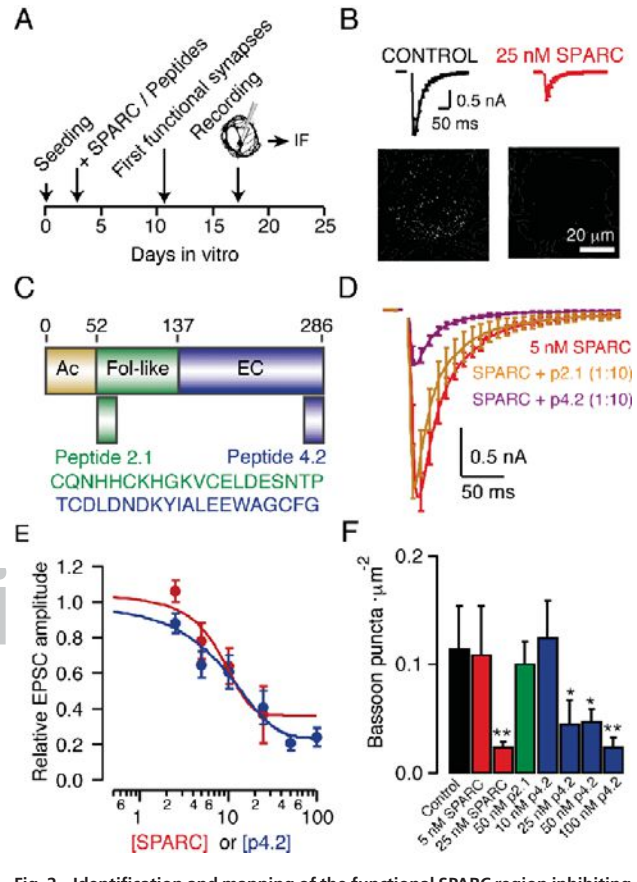
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204



**Fig. 1. Variations in SPARC production during refinement of cholinergic innervation in two different vertebrate structures.** A) Section of a rat superior cervical ganglion at postnatal day 12 showing the distribution of SPARC around synapses. B) Time course of postnatal SPARC production in the rat superior cervical ganglion. C) Relative changes of SPARC levels in the tail of *X. tropicalis* tails tadpoles during normal development. The relationship of Nieuwkoop-Faber stages to days post fertilization is indicated. Images show the characteristic morphology of tadpoles at the stages of: embryogenesis (Emb), premetamorphosis (PreM), prometamorphosis (ProM), metamorphosis climax and postmetamorphosis (PostM). Data from B) and C) are normalized to maximum SPARC production and indicate mean  $\pm$  s.e.m.

production was again low in the adult, suggesting that maximal protein levels were relevant for refinement of cholinergic innervation in sympathetic ganglia.

Due to the high conservation of SPARC through metazoan evolution (19), we considered that observed developmental changes in SPARC secretion could also be important for the innervation of other cholinergic vertebrate structures. The tails of *Xenopus* larvae offered an ideal window to evaluate this possibility, because multiple neuromuscular junctions are formed and eliminated following a stereotyped program (20). In agreement with previous observations in *X. laevis* (21), SPARC levels were minimal at the end of *X. tropicalis* embryogenesis, when tadpole swimming is exclusively driven by tail movements (St.40-52; Fig. 1C, Suppl. Fig. 1). As development progressed, SPARC levels constantly increased until reaching a peak just before the climax of metamorphosis (St.59-60). At this stage tadpoles switch to leg swim, tail resorption program starts (22), the primary motor pool controlling tail movements becomes eliminated and the secondary motor neuron pool starts to drive limb locomotion (23). Alongside with findings obtained for rat superior cervical ganglion, our observations supported maximal SPARC produc-



**Fig. 2. Identification and mapping of the functional SPARC region inhibiting synaptic development.** A) Schematic diagram of the experimental procedure used to investigate the inhibitory role of SPARC on synaptogenesis. The time course of *in vitro* synaptic development is indicated. B) Effect of SPARC on evoked autaptic currents and the density of presynaptic terminals, visualized as bassoon puncta. C) Amino acid sequence and location of peptides 2.1 and 4.2 in the full-length protein. D) Average EPSC of neurons developed in the presence of 5 nM SPARC (n=24), 5 nM SPARC+50 nM p2.1 (n=8) and 5 nM SPARC+50 nM p4.2, (n=29). E) Relative decay in EPSC amplitude as a function of [SPARC] or [p4.2]. Sigmoidal fits of averaged data (from n=6 to n=24 independent observations), revealed a [SPARC]<sub>50</sub> and [p4.2]<sub>50</sub> of 13 nM and 14 nM, respectively. F) Summary of SPARC derived peptides on the density of bassoon puncta. (control, n=14; 5 nM SPARC, n=10; 25 nM SPARC, n=6; 50 nM p2.1, n=5; 10 nM p4.2, n=12; 25 nM p4.2, n=7; 50 nM p4.2, n=17; 100 nM p4.2, n=6). All averages are indicated as mean  $\pm$  s.e.m. Significance level is set to  $p < 0.01$  (\*) or  $p < 0.001$  (\*\*).

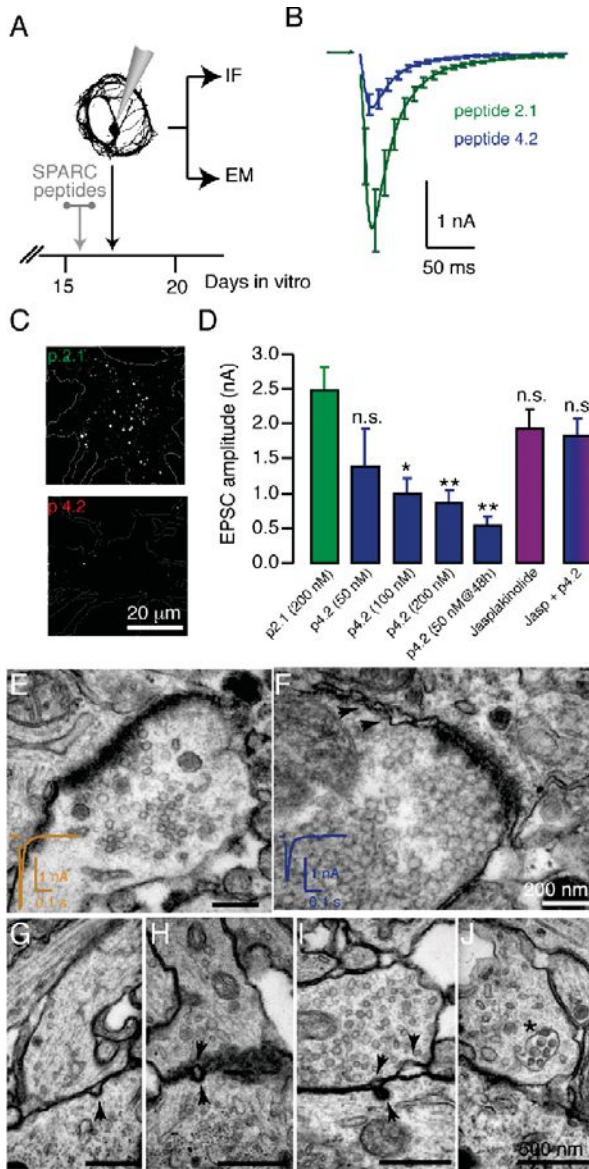
tion occurred concomitantly to synapse elimination in cholinergic vertebrate structures.

**SPARC inhibits formation of cholinergic synapses**

The direct involvement of SPARC on synapse elimination was investigated using Single Cell Microcultures (SCMs), that were obtained from the rat superior cervical ganglion (see for details 15). SCMs allow investigating fast cholinergic neurotransmission in the absence of glia, thus being possible to examine synaptic effects of glial secreted factors just by adjusting the composition of the extracellular medium. Application of SPARC from 5 to 25 nM during the whole period of synaptogenesis (Fig. 2A), decreased synaptic responses in a concentration dependent manner. Although the time course of *in vitro* neuronal development was apparently unaffected, quantification of functional synapses from recorded microcultures supported SPARC interfered with their development. For example, exposure to 25 nM SPARC caused a three-fold decrease in the density of mature presynaptic terminals

205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272

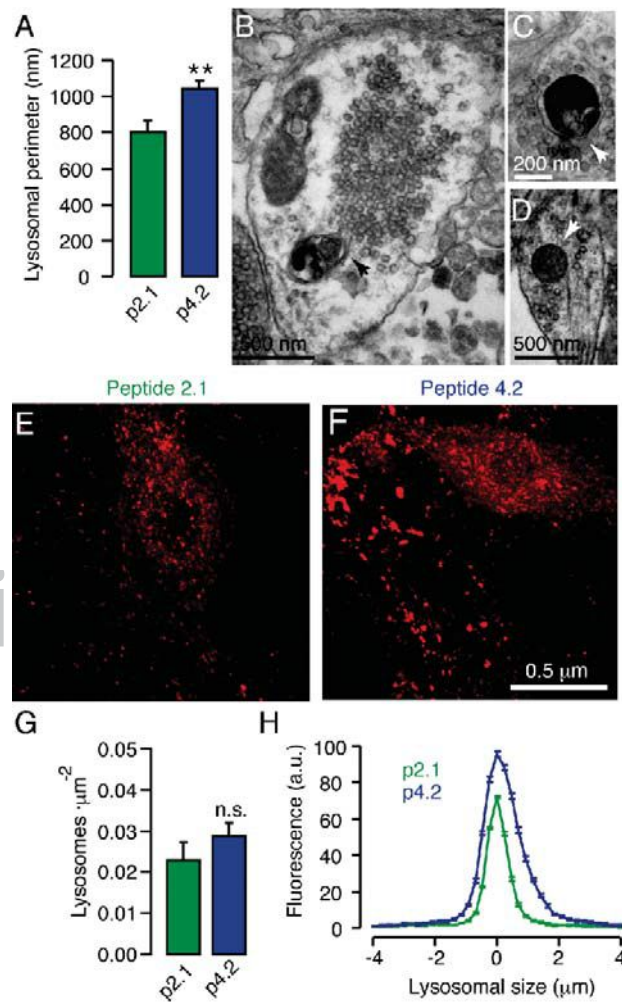
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340



**Fig. 3. SPARC peptide 4.2 triggers the disassembly of mature cholinergic synapses.** **A)** Experimental protocol used to investigate the role of SPARC derived peptides on the activity of stable synapses. **B)** Average EPSCs of mature neurons acutely exposed to p2.1 (n=8) or p4.2 (n=33). **C)** Peptide 4.2 decreased the number of functional presynaptic terminals measured as bassoon puncta. **D)** The amplitude of postsynaptic responses decreased as a function of [p4.2]. Exposure to p2.1 did not modify EPSC amplitude. All peptides were incubated 4 to 6 h before recording, otherwise indicated. Notice that jasplakinolide inhibited p4.2 effects (200 nM p2.1, n=13; 50 nM p4.2, n=18; 100 nM p4.2, n=6; 200 nM p4.2, n=16; 1  $\mu$ M jasplakinolide, n=11; 1  $\mu$ M jasplakinolide + 200 nM p4.2, n=12). **E)** Image from a control presynaptic terminal. Corresponding EPSC is shown in orange. **F)** Image from a presynaptic terminal treated for 48 h with p4.2. Arrows indicate membrane invaginations near an active zone. **G, H, I, J)** Images from four different synapses treated with p4.2. Notice the presence of pre and postsynaptic endocytic profiles (arrows). **I)** shows a presynaptic terminal containing a multivesicular body (asterisk). All averages indicate mean  $\pm$  s.e.m. Significance level was set to  $p < 0.01$  (\*) or  $p < 0.001$  (\*\*).

(Fig. 2B), from  $0.1 \pm 0.04$  bassoon puncta  $\cdot \mu\text{m}^2$  (n=14) to  $0.03 \pm 0.005$  bassoon puncta  $\cdot \mu\text{m}^2$  (n=6).

Footline Author

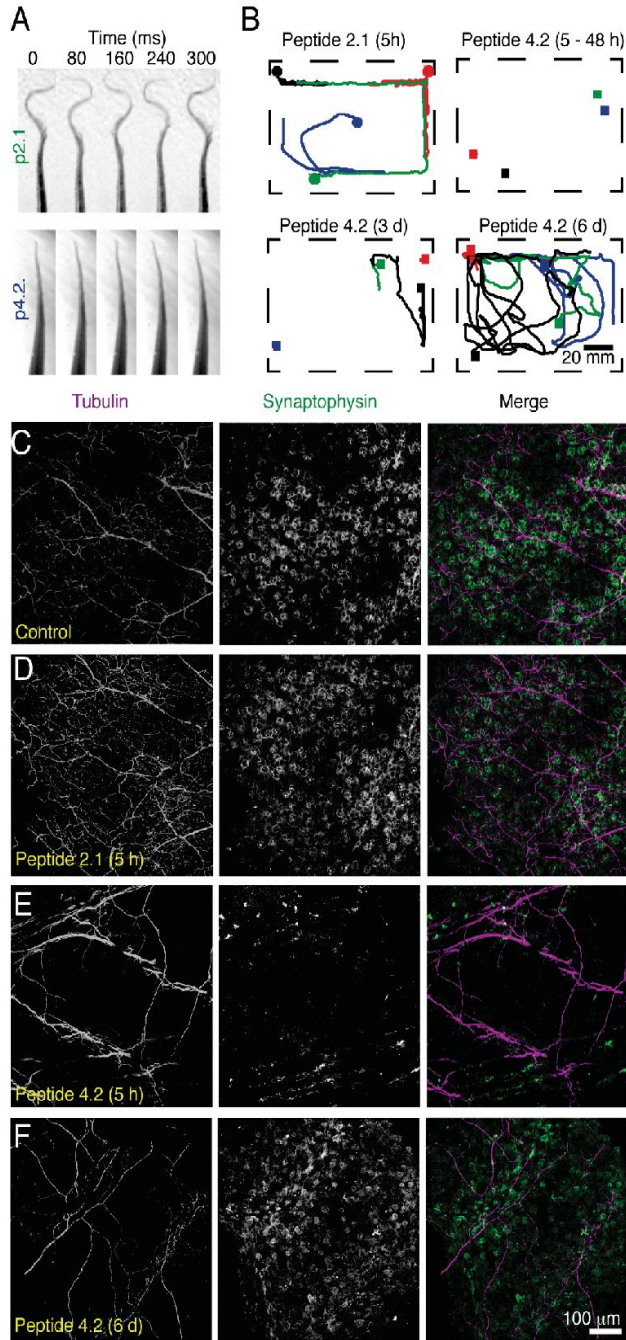


**Fig. 4. SPARC peptide 4.2 activates the formation of secondary lysosomes in mature presynaptic terminals.** **A)** Lysosomes of neurons treated with p4.2 (n=49) are larger than those found upon acute p2.1 exposure (n=40). **B)** A secondary lysosome located in a presynaptic terminal treated with p4.2 (arrow). **C)** A secondary lysosome formed by the fusion to a multivesicular body. **D)** A lysosome found in a retracting axon terminal. **E, F)** Images of two different neurons stained with lysotracker red. **G)** The density of lysosomes in the neuritic tree does not change ( $p=0.25$ ) upon treatment with p2.1 (n=12) and p4.2 (n=12). **H)** Average of line profiles from lysosomes found in neurons treated with p2.1 and p4.2 (both groups n=900, coming from 75 puncta of 12 neurons). Control full width at half maximum of 436 nm is almost doubled to 821 nm upon exposure to p4.2. All averages show mean  $\pm$  s.e.m. Significance level was  $p < 0.001$  (\*\*).

Full-length SPARC contains three distinct conserved domains (Fig. 2C): NH<sub>2</sub>-terminal acidic domain (NT), follistatin-like domain (FS), and the C-terminal domain (EC). To investigate what region of the protein was responsible for synaptic effects, and taking into account that FS and EC domains mediate most SPARC actions, we used peptides 2.1 and 4.2 that derive from FS and EC domains, respectively. Both peptidic sequences are active on non-neuronal cells, showing comparable properties to the full-length protein, as for example, disruption of focal adhesions (24). Peptides were applied in combination with 5 nM SPARC, a concentration that does not affect the amplitude of synaptic responses but arrests terminals to an immature stage (14). Mixing 5 nM SPARC with 50 nM p2.1 did not change EPSC amplitude, however, synaptic responses were reduced when SPARC was

341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408

409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476



**Fig. 5. SPARC peptide 4.2 induces retraction of motor neuron axons and impairs tadpole swim.** **A)** Images from tadpole tails showing how the characteristic ~ 3 Hz tail beat is blocked by local injection with p4.2 but is unaffected by p2.1. **B)** Swimming activity integrated over 30 s. Motor behavior is transiently affected by p4.2, shown by tracking movements of four different tadpoles (squares) at three consecutive time points: 5-48h, 3 days and 6 days. Swimming is unaffected by p2.1. See also supplementary movies 1-4. **C-F)** Staining of *X. tropicalis* tadpole tails for acetylated tubulin and synaptophysin to indicate the location of axons and presynaptic terminals, respectively. Notice how neuromuscular junctions virtually disappear 5h after p4.2 injection but become evident within 6 days.

combined in a 1:10 ratio with p4.2 (Fig. 2D). The effect was

reminiscent of 25 nM SPARC application (compare Fig. 2B to 2D).

Actually, peptide 4.2 retained SPARC actions, as shown by the reduction of EPSC amplitude at  $[p4.2]_{50}$  of ~14 nM, almost identical to the  $[SPARC]_{50}$  of ~ 13 nM (Fig. 2E). Application of p4.2 alone also caused a concentration-dependent decrease in the density of mature presynaptic terminals (Fig. 2F). In contrast, p2.1 was completely ineffective. Altogether, our results show that p4.2 is an active, inhibitory peptide of synaptogenesis, displaying an analogous effect to full-length SPARC.

#### Peptide 4.2 triggers cell-autonomous elimination of cholinergic synapses

To assay the activity of SPARC on fully functional synapses we transiently incubated SCMs once normal development was completed (Figs. 2A and 3A), with SPARC derived peptides p2.1 (lacking synaptogenic effects) or p4.2 (inhibitor of synaptogenesis). Application of 50 nM p4.2 reduced the amplitude of synaptic currents by four-fold (Fig. 3B). To confirm that the decrease in synaptic currents could be attributed to a lower number of operative synapses, recorded neurons were stained for the active zone marker bassoon (Fig. 3C). On average, the number of functional presynaptic terminals- $\mu$ m<sup>2</sup> was reduced from  $0.12 \pm 0.04$  (n=14) to  $0.04 \pm 0.01$  (n=21). Neither neurotransmission nor the number of synaptic contacts was affected when p2.1 was applied. The effects of 50 nM p4.2 were only significant when the incubation time was 24-48 h. For shorter periods, *ie* 4-6 h, it was necessary to increase  $[p4.2]$  up to 200nM to obtain a reduction of synaptic currents and presynaptic terminal density. The effect was comparable to incubation with 50nM p4.2 during 48h (Fig. 3D). Thus the acute decrease of functional synapses by p4.2 was time and concentration dependent. Effects were blocked when the peptide was applied in combination with jasplakinolide, a drug that stabilizes actin filaments. Presumably, disruption of the actin cytoskeleton was involved in the p4.2 triggered loss of synaptic contacts (Fig. 3D).

To visualize how the morphology of mature synapses was affected by acute exposure to SPARC peptides, some of the recorded microcultures were inspected by electron microscopy. Control presynaptic terminals showed prominent active zones and abundant cytoplasmic vesicles (Fig 3E). However, upon exposure to p4.2, terminals retaining a normal morphology displayed frequent endocytic shapes and invaginations in the vicinity of active zones (Fig. 3F). Hallmarks of endocytosis were also increased at the postsynaptic level (Fig. 3G). In some synapses characteristic cup-shaped membrane invaginations were observed when pre and postsynaptic omega-shapes occurred simultaneously (Figs 3H, I and Suppl. Fig. 2). Tightly coupled pre and postsynaptic invaginations together with the high density of endocytic shapes, suggested synaptic contacts were detaching.

Further evidence favoring the onset of a program of synapse elimination was the formation of large endosomal structures. Control presynaptic terminals rarely showed large endocytic compartments at rest (25). However, upon acute exposure to p4.2, multivesicular bodies were frequently observed (Fig. 3J). Large endosomes were formed in a cell-autonomous manner and occurred in different shapes and sizes, all containing diverse axonal material (see also Suppl. Fig.2). Concomitantly to the formation of multivesicular bodies, lysosomal activity was enhanced. Lysosomes increased their size by 30% (Fig. 4A). Putative secondary lysosomes were frequently observed in presynaptic terminals (Figs. 4B and C), as well as retracting axon tips (Fig. 4D, Suppl. Fig. 2). Incubation of SCMs with lysotracker red showed the density of these acidic compartments was essentially unaffected by exposure to any of the SPARC peptides (Figs. 4E-G), however, differences in size were obvious. Acute exposure to p4.2 increased the perimeter of lysosomes (Fig. 4H). This last observation reinforced electron microscopy data suggesting

477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544

545 p4.2 induced transition from primary to secondary lysosomes.  
546 Altogether, optical and electron microscopy describe an *in vitro*  
547 phenotype resembling some aspects of the developmental elimin-  
548 ation of synaptic inputs in the mouse neuromuscular junction,  
549 characterized by an increase of lysosomal activity (8).

#### 550 Peptide 4.2 triggers the elimination of neuromuscular junc- 551 tions *in vivo*

552 To investigate the relevance of a SPARC mediated program  
553 of synapse elimination *in vivo*, we used *X. tropicalis* tadpoles.  
554 SPARC secretion is developmentally regulated in the tadpole tail,  
555 such as lowest protein levels are found during embryogenesis and  
556 premetamorphosis (Fig. 1). In the developmental period found  
557 between Nieuwkoop-Faber stages 48 to 54 (26) limbs are not  
558 present and swimming is exclusively controlled by tail beats, which  
559 occur at ~ 3 Hz (Fig. 5A). The characteristic motor behavior of  
560 tadpoles alternating continuous swim with idle times (movie S1)  
561 was unaffected upon injection of 300 pmols of p2.1 (see Sup-  
562 plementary methods for details), however, was impaired when  
563 the same amount of p4.2 was applied (movie S2). Effects were  
564 evident from 3 to 5h after injection and ranged from a decrease  
565 in tail beat frequency to an apparent tail paralysis. Complete  
566 absence of tail oscillations occurred in approximately 10% of  
567 animals. Motor deficits did not affect normal development and  
568 tadpoles progressed to the stage of prometamorphosis. Growth  
569 was unaffected because virtual paralysis was restricted to a time  
570 window of 48h after peptide injection (Fig. 5B). During this acute  
571 phase tails were completely straight (Fig. 5A), which induced a  
572 characteristic resting side position in some animals. Swimming  
573 periods of animals injected with p4.2 lasted few seconds. Tadpoles  
574 appeared "fatigued" and rapidly returned to inactive states likely  
575 reflecting the inability to recruit all tail muscles (movie S2). The  
576 lack of motor movements controlled at the spinal cord level con-  
577 trasted with apparently normal buccal pumping and heartbeat.  
578 Normal autonomic functions suggested that rostral portions of  
579 central nervous system connectivity were not targeted by peptide  
580 injections. The correct processing of mechanosensitive stimuli  
581 activating lateral line and trigeminal receptors (27) reinforced  
582 this view, because occasional collisions among tadpoles or ex-  
583 ternal mechanical stimuli always activated a response driven by  
584 tail swim. Thus, normal hindbrain-mediated responses indicated  
585 p4.2 injections at the tail level were restricted to spinal cord  
586 connectivity, without affecting upper neuronal structures.

587 Three days after p4.2 injection, spontaneous tail oscillations  
588 become evident. Characteristic tail flickering reappeared for  
589 short periods and tadpoles reduced their inactivity time (movie  
590 S3). Yet swimming was not spontaneous and was only evoked  
591 by mechanical stimuli. It was six days after injection when a  
592 rather natural swim reappeared and tail movements lasted longer  
593 (Fig. 5B movie S4). The recovery of normal motor behavior was  
594 not evaluated further since tadpoles were initiating prometa-  
595 morphosis, when swimming becomes coordinated by movements  
596 from limbs and tail (20). At this stage, the primary but also the  
597 secondary motor neuron pool drive motor responses. Tadpoles  
598 injected with p4.2 followed their normal developmental program  
599 and reached the climax of metamorphosis.

600 The nature of motor deficits observed upon p4.2 injection  
601 was investigated by staining tadpole tails for acetylated tubulin  
602 and synaptophysin to label axonal tracts and presynaptic ter-  
603 minals, respectively. Motor axons emanating from the spinal  
604 cord branched along the tail forming numerous neuromuscular  
605 junctions (Fig. 5C), likely poly-innervating muscle fibers (28).  
606 The characteristic distribution of neuromuscular synapses was  
607 unaffected by injection of p2.1 peptide (Fig. 5D), however, con-  
608 nectivity was completely altered in tadpoles showing a severe  
609 impairment of swimming behavior after p4.2 injection. Most of  
610 the tail neuromuscular junctions were absent and thin axonal  
611 branches were pruned (Fig. 5E). Peptide 4.2 triggered a process

612 of synapse elimination characterized by the retraction of synaptic  
613 terminals and axonal microtubules. Pruning of axonal processes  
614 was evident by confocal and light-sheet microscopy, where pu-  
615 tative retraction bulbs (29) were observed (SI, movies S5 and  
616 S6). Tadpoles recovered swimming abilities when neuromuscular  
617 junctions reformed 6 days after p4.2 injection (Fig. 5F), albeit  
618 connectivity was different from controls (movie S7). Although  
619 the density of neuromuscular junctions was apparently normal,  
620 the network of thin axonal branches was less obvious, suggesting  
621 some innervation defects. This could explain why tadpoles did not  
622 show a full recovery of swimming abilities.

#### 623 DISCUSSION

624 Matricellular proteins, such as SPARC, are maximally produced  
625 during a restricted time window of normal development (30). We  
626 show that in vertebrate cholinergic structures, SPARC levels peak  
627 when connectivity is refined (Fig. 1). By acting through a peptidic  
628 sequence located in its EC domain, SPARC triggers disassembly  
629 of pre and postsynaptic terminals (Fig. 2), setting the onset of  
630 a neuronal, cell-autonomous program of synapse elimination. As  
631 synaptic contacts retract, multivesicular bodies are generated and  
632 digested by lysosomes (Figs. 3-4), driving to the loss of functional  
633 innervation (Fig. 5).

634 Our results support a fundamental role for the secretory  
635 activity of glial cells during refinement of neuronal circuit con-  
636 nectivity. Besides favouring the establishment of synaptic con-  
637 tacts by releasing synaptogenic factors, such as thrombospondin,  
638 glypicans or hevin (9-11), glia through SPARC secretion can  
639 also inhibit formation and consolidation of synaptic contacts.  
640 Based on previous and current *in vitro* evidences, the effects are  
641 concentration dependent and range from arresting maturation  
642 of presynaptic terminals (5 nM, see also 14) to their elimination  
643 ( $\geq 20$  nM). However, the effective SPARC concentration in a  
644 biological relevant context and thus its specific inhibitory action  
645 would be determined by three factors: *i*) the quantity and location  
646 of secretory events in glial processes relative to synapses (14), *ii*)  
647 the presence of competitive antagonists, such as hevin (10) and  
648 *iii*) cleavage by matrix metalloproteases (31). Exposure of full-  
649 length SPARC to collagenase-3, gelatinase A, gelatinase B and  
650 matrilysin releases a 91 aa peptide containing p4.2. In the light  
651 of our results, such fragment generated by specific cleavage, could  
652 mimic synaptic actions of SPARC and thus participate determin-  
653 ing the effective protein concentration in the extracellular space.

654 But the onset of a program of synapse elimination triggered  
655 by SPARC also depends upon the expression of a specific neu-  
656 ronal receptor. A possible candidate is the integrin  $\alpha 5 \beta 1$  complex,  
657 which binds p4.2 (32) and is expressed in *Xenopus* neuromuscular  
658 active zones (33). In non-neuronal cells, interaction of SPARC  
659 to  $\beta 1$  integrin complexes linked to cytoskeletal proteins such as  
660 talin or actin mediates the loss of focal adhesions (24, 32, 34).  
661 *In vitro* results using jasplakinolide (Fig. 3D) support recalling  
662 an analogous mechanism in synapses, by which depolymerization  
663 of synaptic F-actin cytoskeleton could drive to disruption of  
664 active zones and disorganization of synaptic vesicle pools (35,  
665 36). Resulting presynaptic endosomal structures could end being  
666 digested within neurons, however, we cannot exclude that *in vivo*  
667 activation of same program, ultimately involves phagocytosis by  
668 glial cells, i.e. axosome shedding (2). Alternatively, pruning of  
669 axonal branches in the tail of *X. tropicalis* tadpoles (Fig. 5E)  
670 could also be attributed to a direct action of SPARC on the  
671 cytoskeleton. The secreted protein can be internalized upon bind-  
672 ing to integrins (37), allowing the interaction with cytoskeletal  
673 elements, such as  $\alpha$ -tubulin (38). Whether this interaction leads to  
674 the elimination of microtubules is unknown. However, an action  
675 of SPARC requiring its internalization is also favored by jas-  
676 plakinolide results, because stabilization of the actin cytoskeleton  
677 disrupts receptor mediated endocytosis (39).

681 Considering the elimination of synapses is dictated by neuronal activity (40), could the actions of SPARC be related to firing patterns in neurons? At the neuronal level synaptic activity could drive the heterogeneous expression of putative SPARC receptors, i.e. particular integrin  $\beta 1$  complexes (41), or affect clathrin mediated endocytosis (25). In this way subsets of synapses would show different susceptibility of being eliminated. But also the capacity of glial cells to sense neuronal activity during development, should be taken into account (42). Terminal Schwann cells compete for perisynaptic space during development (43) and are capable to decipher among weak and strong inputs by differentially increasing their free  $[Ca^{2+}]$  (44). Changes in glial free  $[Ca^{2+}]$  could thus affect SPARC secretion, either by promoting exocytosis or by altering the transcriptional control of the protein.

695 Taken together, our results prompt to consider SPARC as a trigger for cholinergic synapse elimination. Besides constitutively engulfing axonal debris (3, 43), glial cells timely release SPARC to decide the fate of synaptic contacts.

## 700 METHODS

- 701 1. Watts RJ, Schuldiner O, Perrino J, Larsen C, & Luo L (2004) Glia engulf degenerating axons during developmental axon pruning. *Curr Biol* 14(8):678-684.
- 702 2. Bishop DL, Misgeld T, Walsh MK, Gan WB, & Lichtman JW (2004) Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding. *Neuron* 44(4):651-661.
- 703 3. Chung WS, et al. (2013) Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504(7480):394-400.
- 704 4. Smith IW, Mikesch M, Lee Y, & Thompson WJ (2013) Terminal Schwann cells participate in the competition underlying neuromuscular synapse elimination. *J Neurosci* 33(45):17724-17736.
- 705 5. Schafer DP, et al. (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74(4):691-705.
- 706 6. Stevens B, et al. (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131(6):1164-1178.
- 707 7. Stephan AH, Barres BA, & Stevens B (2012) The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci* 35:369-389.
- 708 8. Song JW, et al. (2008) Lysosomal activity associated with developmental axon pruning. *J Neurosci* 28(36):8993-9001.
- 709 9. Christopherson K, et al. (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120(3):421-433.
- 710 10. Kucukdereli H, et al. (2011) Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- 711 11. Allen NJ, et al. (2012) Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* 486(7403):410-414.
- 712 12. Vincent A, Lau P, & Roskams A (2008) SPARC is expressed by macroglia and microglia in the developing and mature nervous system. *Dev Dyn* 237(5):1449-1462.
- 713 13. Jones EV, et al. (2011) Astrocytes control glutamate receptor levels at developing synapses through SPARC-beta-integrin interactions. *J Neurosci* 31(11):4154-4165.
- 714 14. Albrecht D, et al. (2012) SPARC prevents maturation of cholinergic presynaptic terminals. *Mol Cell Neurosci* 49(3):364-374.
- 715 15. Perez-Gonzalez A, Albrecht D, Blasi J, & Llobet A (2008) Schwann cells modulate short-term plasticity of cholinergic autaptic synapses. *J Physiol* 586(Pt 19):4675-4691.
- 716 16. Rubin E (1985) Development of the rat superior cervical ganglion: initial stages of synapse formation. *J Neurosci* 5(3):697-704.
- 717 17. Aguayo AJ, Peyronnard JM, Terry LC, Romine JS, & Bray GM (1976) Neonatal neuronal loss in rat superior cervical ganglia: retrograde effects on developing preganglionic axons and Schwann cells. *J Neurocytol* 5(2):137-155.
- 718 18. Lichtman JW & Purves D (1980) The elimination of redundant preganglionic innervation to hamster sympathetic ganglion cells in early post-natal life. *J Physiol* 301:213-228.
- 719 19. Martinek N, Zou R, Berg M, Sodek J, & Ringuette M (2002) Evolutionary conservation and association of SPARC with the basal lamina in Drosophila. *Dev Genes Evol* 212(3):124-133.
- 720 20. Combes D, Merrywest SD, Simmers J, & Sillar KT (2004) Developmental segregation of spinal networks driving axial- and hindlimb-based locomotion in metamorphosing *Xenopus laevis*. *J Physiol* 559(Pt 1):17-24.
- 721 21. Damjanovski S, Malaval L, & Ringuette MJ (1994) Transient expression of SPARC in the dorsal axis of early *Xenopus* embryos: correlation with calcium-dependent adhesion and electrical coupling. *Int J Dev Biol* 38(3):439-446.
- 722 22. Brown DD & Cai L (2007) Amphibian metamorphosis. *Dev Biol* 306(1):20-33.
- 723 23. Forehand CJ & Farel PB (1982) Spinal cord development in anuran larvae: I. Primary and secondary neurons. *J Comp Neurol* 209(4):386-394.

All animal procedures were approved by the Department of Environment from Generalitat de Catalunya. Methods regarding the establishment of Single Cell Microcultures (SCMs) from superior cervical ganglion neurons and correlative electrophysiology and optical or electron microscopy have been described elsewhere (14, 15). Detailed protocols for experiments involving SCMs, maintenance of the *X. tropicalis* colony, quantification of SPARC levels and whole-mount immunohistochemistry of tadpole tails are described in the Supplementary Information.

### 755 Statistical analysis

To evaluate differences between two experimental groups unpaired Student t-test was used. Comparison among three or more groups was made by one-way ANOVA, followed by Bonferroni post hoc test.

### 758 ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants of MINECO (SAF 2012-36375) and Fundació La Marató de TV3 (111530) to A.L. This research was supported in part by competitive research awards from the M.G.F. Fuertes Memorial Fellowship, the Stephen W. Kuffler Fellowship Fund, the Laura and Arthur Colwin Endowed Summer Research Fellowship Fund, the Fischbach Fellowship and the Great Generation Fund of the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA where a portion of this work was conducted under the auspices of these awards. F. L was recipient of a MINECO predoctoral fellowship (BES-2010-032355). We thank the Electron Microscopy unit (Campus Casanova) of Centres Científics i Tecnològics of the University of Barcelona for their involvement and support and Daniel Colon-Ramos for his valuable comments. The authors declare no competing financial interests

- 760 24. Murphy-Ullrich JE, Lane TF, Pallero MA, & Sage EH (1995) SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca(2+)-binding EF-hand. *J Cell Biochem* 57(2):341-350.
- 761 25. López-Murcia FJ, Royle SJ, & Llobet A (2014) Presynaptic clathrin levels are a limiting factor for synaptic transmission. *J Neurosci* 34(25):8618-8629.
- 762 26. Nieuwkoop PD & Faber J (1956) *Normal table of Xenopus laevis (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis.* (Amsterdam: North-Holland Publishing Company. Guilders) p 243.
- 763 27. Buhl E, Roberts A, & Soffe SR (2012) The role of a trigeminal sensory nucleus in the initiation of locomotion. *J Physiol* 590(Pt 10):2453-2469.
- 764 28. McDiarmid R & Altig R (1999) *Tadpoles: The biology of anuran larvae* (The University of Chicago Press).
- 765 29. Gan WB & Lichtman JW (1998) Synaptic segregation at the developing neuromuscular junction. *Science* 282(5393):1508-1511.
- 766 30. Murphy-Ullrich JE & Sage EH (2014) Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol* 37:1-14.
- 767 31. Sasaki T, et al. (1997) Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J Biol Chem* 272(14):9237-9243.
- 768 32. Nie J, et al. (2008) IFATS collection: Combinatorial peptides identify alpha5beta1 integrin as a receptor for the matricellular protein SPARC on adipose stromal cells. *Stem Cells* 26(10):2735-2745.
- 769 33. Cohen MW, Hoffstrom BG, & DeSimone DW (2000) Active zones on motor nerve terminals contain alpha 3beta 1 integrin. *J Neurosci* 20(13):4912-4921.
- 770 34. Weaver MS, Workman G, & Sage EH (2008) The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta1 and activation of integrin-linked kinase. *J Biol Chem* 283(33):22826-22837.
- 771 35. Nelson JC, Stavoe AK, & Colón-Ramos DA (2013) The actin cytoskeleton in presynaptic assembly. *Cell Adh Migr* 7(4):379-387.
- 772 36. Goda Y & Davis GW (2003) Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron* 40(2):243-264.
- 773 37. Nakamura K, Yamanouchi K, & Nishihara M (2014) Secreted protein acidic and rich in cysteine internalization and its age-related alterations in skeletal muscle progenitor cells. *Aging Cell* 13(1):175-184.
- 774 38. Huynh MH, Sodek K, Lee H, & Ringuette M (2004) Interaction between SPARC and tubulin in *Xenopus*. *Cell Tissue Res* 317(3):313-317.
- 775 39. Yarar D, Waterman-Storer CM, & Schmid SL (2005) A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 16(2):964-975.
- 776 40. Colman H, Nabekura J, & Lichtman JW (1997) Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. *Science* 275(5298):356-361.
- 777 41. Lin CY, Lynch G, & Gall CM (2005) AMPA receptor stimulation increases alpha5beta1 integrin surface expression, adhesive function and signaling. *J Neurochem* 94(2):531-546.
- 778 42. Darabid H, Perez-Gonzalez AP, & Robitaille R (2014) Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. *Nat Rev Neurosci* 15(11):703-718.
- 779 43. Brill MS, Lichtman JW, Thompson W, Zuo Y, & Misgeld T (2011) Spatial constraints dictate glial territories at murine neuromuscular junctions. *J Cell Biol* 195(2):293-305.
- 780 44. Darabid H, Arbour D, & Robitaille R (2013) Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci* 33(4):1297-1313.

# AGRADECIMIENTOS

*"Da siempre lo mejor de ti, y lo mejor vendrá...."*

Teresa de Calcuta



Comienzo agradeciendo al Ministerio de Economía y Competitividad la concesión de la beca de formación de personal investigador, que me ha permitido llevar a cabo uno de mis sueños, hacer ciencia. Espero que en España, algún día la investigación sea un pilar para el desarrollo del conocimiento y para el progreso. Ojalá los científicos españoles tengamos cabida en nuestro país.

También quiero agradecer al Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) y a la Universitat de Barcelona, y en particular al Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, por el espacio, el material y todas las herramientas para mi formación y para el desarrollo de esta tesis doctoral.

Agradezco a los miembros del tribunal de esta tesis, los doctores: Ramón Trullàs, Gertrudis Perea, Ana Méndez, Manel Santafé, Pau Gorostiza y Raúl Estévez, su tiempo y su dedicación. Las sugerencias, comentarios y preguntas, seguro me ayudarán a razonar y a mejorar como científico.

Los primeros pasos del camino que comienzo se los debo a mi director de tesis. He tenido la gran suerte de formar parte del equipo de un gran científico, el Dr. Artur Llobet. Gracias por darme la oportunidad. La formación ha sido impecable. Me has transmitido como nadie la pasión por la ciencia, y me has ayudado a canalizar mis inquietudes y a encontrar mi camino en la neurofisiología. Gracias por tantas horas enseñándome a razonar, por mostrarme la elegancia y la finura del trabajo bien realizado, por transmitirme los valores científicos de la paciencia, la constancia, la rigurosidad y la eficacia. Gracias por todo el apoyo personal y humano. Siempre serás mi mentor científico.

En alguno de los éxitos de esta tesis también ha contribuido otro gran investigador, el Dr. Stephen J. Royle de la Universidad de Warwick. Le agradezco la participación en el proyecto de la clatrina, aportando experiencia, ideas y herramientas.

También quiero agradecer el entorno científico y humano que me ha rodeado, dirigido por el Dr. Carles Solsona. Siempre recordaré nuestras conversaciones y los razonamientos que me ayudaron a mejorar. Ha sido un placer formarme en su equipo. Muchas gracias por hacerme sentir uno más. Dr. Joan Blasi, con usted he aprendido muchísimos conocimientos en general. Es un fuente de ingenio. Gracias por su calidad humana y su cercanía. Dra. Mireia Martín, gracias por su disposición, su cercanía y por todos los buenos momentos que hemos tenido en el laboratorio. También le agradezco la oportunidad de formarme más con los conocimientos adquiridos en las prácticas. Dr. David Soto: David, ha sido un gran honor haberte visto comenzar tu carrera como investigador principal. Eres un gran científico y un referente para mí. Pero además, eres un gran amigo y siempre formarás parte de mi vida. Hemos tenido grandes momentos juntos y nos han unido mucho. Gracias a ti, a Anna y tus hijos por todo lo vivido.

Inma, eres el centro del laboratorio, imprescindible. Nuestros pies y nuestras manos. Sin ti, nada funcionaría. Tengo que agradecerte tantas cosas. Me has transmitido muy buena energía y siempre has estado cercana para ayudarme en todo lo que he necesitado. Perdona por volverte loca a veces con mi aceleramiento. Pedro, ha sido todo un honor haber trabajado contigo. Gracias por toda la gestión de animales, que siempre es un arduo trabajo. Además, nos hemos hecho buenos amigos. Tu calidad humana es impresionante. Siempre me lo has transmitido en nuestras conversaciones. Pilar, gracias por tu cercanía y tu disposición y por el maravilloso trato.

Estos cuatro años y medio han resultado un largo y difícil camino. Dejé Murcia para comenzar mi sueño, y me encontré a un grupo de personas que me han robado el corazón, y que han sido mi familia durante este tiempo. Començo a per l'Helena, la meva germana. Gràcies per tot el viscut al teu costat. Vas ser la meva primera llum a Catalunya i la persona generosa que em va obrir la seva casa i la seva família. Hem viscut gran moments junts: el teu casament amb en Xavi, el naixement d'Ernest i la nostra trajectòria professional. Sempre estarem junts, sigui aquí, allà o on sigui que estiguem cadascú. T'estimo molt. Beatrice, grazie per tutto quello che mi hai aiutato lungo questa volta. Per il vostro rigore professionale che mi ha aiutato nel mio lavoro, per il vostro sostegno personale e la vostra vicinanza, che mi ha fatto sentire come in famiglia. Gracias por todas las conversaciones, los buenos momentos y también por aguantar mis nervios, que es muy difícil. David (Albrecht), junto a Helena, has sido también esa primera luz en esta etapa. Te has portado como un hermano. Hemos estado muy unidos y todo lo que conozco en el laboratorio, comencé a saberlo por ti. Junto a Fabi sois parte de mi familia en el corazón. Allá donde estemos siempre seremos un



equipo. Anna-Priscilla, aunque coincidimos poco en el laboratorio, el tiempo fue muy importante. Tú comenzaste la historia del laboratorio y gracias a tu trabajo y tu esfuerzo, todo ha sido mucho más fácil. Te agradezco los buenos momentos, y el hecho de que siempre me tengas en cuenta. Pablo y Ceci, sois el testigo de toda esta historia. Sois dos personas estupendas, y estoy encantado de haber compartido este tiempito a vuestro lado. Contad conmigo para lo que necesitéis. Siempre intentaré echaros un mano. Os deseo todo lo mejor en el comienzo del camino.

Cris, tengo que decirte que has sido la mejor amiga. Enseguida tuvimos feeling y nunca me equivoqué. No tendré palabras para agradecerte cada uno de los momentos vividos. Me has tratado como uno más de tu familia y tus amigos. Nos hemos escuchado, nos hemos soportado, hemos llorado, nos hemos ultrahipermegaextrasuperreído. Hemos contagiado de alegría a nuestro entorno. Gracias por darme vida en cada momento a tu lado, que será para siempre porque nuestro vínculo permanecerá allá donde estemos. Te quiero mucho wapa. Sebas, mi hermanico. Eres el ejemplo de las personas que de verdad merecen la pena en este mundo. Desde el minuto 1 de conocernos, me metiste en tu vida, con tus amigos y me hiciste sentir uno más de tu entorno. Gracias por aguantarme y por tu cercanía y bondad. Este vínculo no lo quiero romper nunca. Rafa, mi niño. Qué pedazo de amigo y qué pedazo de persona. Desde el primer momento congeniamos, y nos hemos convertido en amigos inseparables. Sólo puedo agradecerte cada buen momento que he vivido a tu lado. Y todos los que nos quedan. Eres una persona muy noble y además muy inteligente. Por eso te auguro un gran futuro profesional. En lo personal siempre estaré a tu lado. Xavi, otro de mis mejores amigos en esta etapa de mi vida y que quiero que sea para siempre. Me has dado una gran energía. Encontrarte por el pasillo es motivo para continuar con una sonrisa, y hacer que la vida sea más positiva. Hemos vivido grandes momentos y aunque casi me matas un día, jajajaja, tengo que decirte que será muy difícil separarme de ti. Eres y serás un gran amigo y aunque creas que cuando me vaya, con lo desastre que soy, perderé los vínculos, podrás comprobar que no será así. Eli, eres genial, noble y sincera. Vaya pedazo de amiga. Me lo paso en grande contigo. Pero además estás siempre dispuesta a ayudarme y a escucharme. Hemos conseguido un lazo muy importante para mí, que quiero que permanezca siempre. Gracias por todos los momentos a tu lado. Natasha, también ha sido otra gran amiga. Tengo que darte las gracias por todo el cariño que siempre me has dado. Te apoyo y te animo para continuar en este camino que has comenzado. Un abrazo muy fuerte a Iván que seguro conseguirá todo lo que se proponga.

Benja, además de ser un gran profesional, has sido un gran amigo. Gracias por tu ayuda en el microscopio. Pero también te agradezco las conversaciones personales, las comidas insuperables, las experiencias compartidas y las risas. Eres genial nene, por eso todo el mundo te quiere tanto. Jonny, pienso en ti y ya me sale la sonrisa. Eso quiere decir que te relaciono con cosas buenas. Siempre nos lo hemos pasado genial, y eres de esas personas con las que se hable de lo que se hable, siempre acabamos riéndonos y convirtiéndolo en algo muy muy positivo. Gracias tío. Esther, gracias por tu cariño, tus conocimientos, tu cercanía y tu positividad. Te has portado genial conmigo. Hemos tenido conversaciones muy gratificantes y siempre me has aportado nuevos puntos de vista. Te considero una gran investigadora constante y currante. Junto a Cristian y Laia, os agradezco los momentos vividos a vuestro lado.

Paolo, pechugueeee!!! Espero que te vaya genial. Eres un crack. Anna, gracias por los momentos y las risas compartidas. Mucha suerte en tu nueva etapa. Laura Teixidó, gracias por las risas y el buen rollo. Bea (de serveis), gracias por los momentos de la comida. A pesar de tu timidez, te hemos ido descubriendo poco a poco y eres genial. Ezequiel, aunque en el lab hemos coincidido por poco tiempo, la vida nos ha ligado por otros lados. Te deseo lo mejor en el proyecto más importante de tu vida. Ya sabes cuál. jijji.

A mis Estévez, con los que tanto he compartido y vivido. Tanit, venga campeona, que somos unos máquinas. Comenzamos juntos y acabamos juntos. Me pareces una persona muy positiva, y te aprecio mucho. Sonia, gracias por todo el buen rollo, las risas y las conversaciones que hemos compartido. Te deseo lo mejor en ese proyecto que comienzas y que mencionaba un poco más arriba. jijijiji. Xavi, eres ejemplo de nobleza. Tío, de verdad que me caes genial. Espero que todo te vaya muy bien, porque lo mereces. Alejandro, gracias por los momentos compartidos. Espero que te vaya bien como profe e investigador. Héctor, mi casi compatriota, te deseo mucha suerte en este camino y estamos en contacto. Carla y Xabi, os deseo todo lo mejor.

Andy y Laura, espero que lo vivido en Barna, se convierta en muchos más momentos bueno fuera. Nos vemos por el mundo. Fabi, ay mi niña. Espero que todo vaya genial. Hemos compartido cantidad de buenos momentos. Te deseo lo mejor en la vida. Porque eres buena y noble. Mucha suerte y siempre estaremos en contacto. Eddi y Miguel, os deseo todo lo mejor en vuestros caminos, amigos. Santi, sevillanico, eres genial nene. Gracias por los momentos vividos y ojalá hubieran sido muchos más, porque congeniamos mucho. Natalia, vamos niña que te comes el mundo. Mercé, contigo hice mi primer cultivo de cromafines, jejeje. Tienes madera, creételo y a por todas. Nuria y Silvia, os deseo todo lo mejor. Lara, casi leemos el mismo días, jiji. Suerte!. Joan y Diana, el buen rollo hecho personas. Os quiero dando caña allá donde estéis. Un abrazo niños. Marc, Marta y Jaume, gracias por tantas risas y buenas sensaciones. Geniales chicos. Gloria, Maricel y Christo, mucha suerte en todo.

A los Isidres...Marga, Irene, Mercedes, Anusha, etc...gracias por los favores, por el hielo seco, por ser nuestros homólogos y por encontrarnos cada día en la comida. Mireia, venga que ya te queda poquito para leer campeona. Gema, Cristian, Inés, etc...gracias por el buen rollo que emanáis.

A los secretarios de la facultad, por vuestro trabajo y por los ratos de risas en el rato de la comida. Especialmente quiero agradecer a los guardias de seguridad: Eugenio y Óscar, etc, todas las noches, tardes y mañanas compartidas. Son 5 minutos de entrar y salir de la facultad pero siempre es un buen momento para comenzar la faena con una sonrisa. Gracias a Antonia, Juani, Farida y Jordi, por tantos cafés y alguna tila que me han tenido que hacer en la cafetería, aunque a veces ha sido larga la espera.

A Dani Poves, un gran amigo de esta última etapa, y que seguro que será para siempre. Gracias por tu cercanía y tu confianza. Me ha encantado conocerte tete, y espero que compartamos muchos más momentos a partir de ahora. Eres genial. Eduardo Herranz, gracias por tu sabiduría y por la positividad que irradias. Seguro que eres un gran profesor y espero no perder el contacto contigo. Gracias a todas las personas que me cruzo diariamente en el gym, con las que hablo y con las que no. Sin saberlo, comparto con vosotros un momento importante de mi día a día.

A Maurizio y Diana, porque fueron parte de mis comienzos en Barcelona. Les agradezco todo lo que he compartido a su lado. Os mando un beso enorme.

A mi secta máster: Clara, Rafa Guerra, Lucía, Rafa Romero, África, David, Pamper, Alan, Paloma, David, Esther, Lucho, Marce, Atenea, Larissa, Mauricio, Fran Costela, etc. Formáis parte de uno de los momentos más importantes de mi vida. Y por eso, seguís siendo parte de ella. Nunca podré agradeceros todo lo que me habéis aportado. Sois el comienzo de todo esto. Os echo mucho de menos chicos. Formáis parte de mi corazón.

Gracias a los doctores Alain Buisson y Karim Bordji, por la oportunidad que tuve en Normandía de hacer una estancia durante la carrera. Gracias a este momento descubrí que la neurociencia era mi vida. Gracias a Javier Ortega por toda la ayuda. Nunca podré agradecerte todo lo que hiciste. A ver si nos vemos pronto, tío. A mi secta Francia: Pura Ventura, Fátima, Diego, Leti, M Carmen, Laura, Alberto, Raúl, Mikäel, Sonia, Valentina, Rami, Cata, Nuria, Albert, Hanna, Penny, Lily, Vilelmini, Mary Angela, etc. Gracias por todas las experiencias y los momentos tan importantes. Formamos la ONU, jajaja. Os deseo todo lo mejor.

A mi Padre, para que algún día valores todo este esfuerzo y te sientas muy orgulloso de mi. Esta tesis también es parte de ti. A mis hermanos: Loli, Juanfra, Mari y Adrián, porque en la sangre tenemos la fuerza. A Charo. Gracias por querer, cuidar y respetar a mi padre. A mis cuñados: Juan, Isa y Juan Diego, gracias por hacer feliz a los míos. A mis sobrinos: Juan Ignacio, Alejandro, Isa, Juanfri, Francisco y Juan Diego, para que os pueda servir de ejemplo en vuestras respectivas vidas. Os quiero.

A mis amigos de alma. Con vosotros sobran las palabras. Me habéis hecho como soy. Me habéis dado forma. El vínculo es tan impresionante que no hay manera de explicarlo. Sois un ejemplo en muchos valores que han calado en mí y han contribuido a mi forma de ser: Gonzalo, mi hermano y alma gemela, te quiero. Víctor, mi energía y mi arroyo, te quiero. Ángela, mi hermana y mi positividad, te quiero. Mónica, mi constancia y mi personalidad, te quiero. Miguel, mi entrega y mi raciocinio, te

quiero. Toñi, mi fuerza y mi emprendimiento, te quiero. Andrew, mi atrevimiento y mi originalidad, te quiero. Lore, mi sonrisa y mi sinceridad, te quiero. Mari, mi bondad y mi generosidad, te quiero. Paula, mi seguridad y mi amabilidad, te quiero. Todo esto es parte de vosotros. También quiero agradecer las alegrías que hemos recibido todos con la llegada de Hugo y Alicia. Sois los sobrinitos de todos nosotros. Os quiero mucho chicos.

A los amigos con los que comparto la vida en diferentes ámbitos y también resultan muy importantes para mí: Alicia, Javi, Encarni, Mayte y Álvaro. Gracias por todos los buenos momentos. Sois geniales.

A todos mis primos porque somos como hermanos y estamos y estaremos unidos para siempre, bajo el mismo legado. Os quiero.

A Tania. "Contigo aprendí, que existen nuevas y mejores emociones. Contigo aprendí, a conocer un mundo nuevo de ilusiones. Aprendí, que la semana tiene más de siete días, a hacer mayores mis contadas alegrías y a ser dicho yo contigo lo aprendí...". Gracias, por enseñarme los valores del amor. Gracias por mostrarme la cara humana de la vida. Gracias por todo lo que he descubierto a tu lado. Todos los lugares, inquietudes, etc. Gracias por enseñarme a ver la belleza y la sensibilidad de las cosas. Gracias por tu lucha, tu fuerza, tu entrega. Eres un ejemplo en mi vida. Gracias por tomarme de la mano y empujarme cuando me ves atascado. Gracias por ser la persona que me escucha y que me hace razonar. Gracias por ser mi compañera y soportar mis malos momentos. Gracias por quererme. Gracias por hacerme sentir especial. Gracias porque contigo la vida tiene un sentido especial. Gracias por que estamos juntos en este barco. Gracias por agarrarme cuando el viento sopla fuerte. Gracias porque tus abrazos son mi duermaveela. Gracias porque está en ti la belleza de cualquier mundo. Compañera, contigo quiero resistir.

A Isa, porque eres parte de mi familia y mi vida. Has luchado y salido adelante y por eso eres el mejor ejemplo. Te admiro y te respeto. Espero poder compartir contigo cantidad de buenos momentos. Te quiero suegra.

A mis abuelos que me protegen y velan desde las estrellas. Abuelo Pepe, eres el mentor de mi vida. Tu ejemplo y tu legado están en mi ADN. Has sufrido el achaque de los indeseables, y has soportado sombras y ausencias. Has vivido en lugares lejanos, y has sentido el vacío de tus raíces. Aún así, has trabajado, has luchado y siempre has sido positivo. Pero el mayor de todos tus valores ha sido, el perdón. Por eso te fuiste en paz con la vida. Gracias por enseñarme la inmensidad del mundo en tu jardín, rodeado de plantas y animales. Esto es tuyo. Totalmente tuyo. Abuela Juana, eres el mayor ejemplo de lucha y sacrificio que nunca jamás conoceremos en la familia. Y a la vez de generosidad y nobleza. Esos valores los aprendiste tú sola, sin padres ni madres que te dejaron cuando eras una niña. Por eso tienen más mérito. Te agradezco todo lo que hiciste por mí. Todo el esfuerzo para ayudarme y conseguir mis propósitos. Os quiero a los dos. Estáis en cada célula de mi cuerpo. También quiero recordar a mis abuelos Dolores y Juan. Esto también es parte de vosotros.

A mi tía Carmen. Esta tesis es tuya tita. Como podré agradecer todo lo que has hecho por mí. No hay palabras ni dinero para poder pagarlo. Es que eres mi vida y mi corazón. Has luchado por mí, y me has sacado adelante como otra madre. Y es por eso que te quiero como a mi madre. Desde la primera enciclopedia, desde el primer libro, me has enseñado los valores de la constancia, la perseverancia y la honradez. Te quiero muchísimo. Gracias por todo. A mi tía Remedios. Esta tesis también es tuya. Porque tu casa ha sido el espacio más precioso que jamás podré recordar. Siempre has tenido las puertas abiertas para reunirnos a todos. Has sido el cobijo de la familia y has sido plenamente generosa con todos. Para mí tita eres un ejemplo, sabes por qué? Porque has trabajado y te has sacrificado a pesar de todas las dificultades, y es el momento de reconocerlo. Para mí eres otra madre. Y te quiero muchísimo. Gracias por todo. A mi madrina Juana, mi ángel de la guarda. Lo has sido toda mi vida y estoy seguro que siempre será así. Tenemos un vínculo especial que no se puede explicar. Tienes la magia y la sabiduría que me han atrapado siempre. Me he criado en tus faldas y me has hecho sentir otro más de tus hijos. Tu ayuda, tus palabras y tus gestos son sanadoras. Esta tesis te pertenece. Te quiero. A mi padrino Pedro. Más que padrino, te has portado como un gran padre para mí. Te tengo que agradecer tantas cosas en la vida. Sobre todo por tratarme como otro de tus hijos, y por sacar las uñas por mí en la vida. Eres una gran persona, con un

corazón noble y generoso. Estoy muy orgulloso de tenerte en mi vida. Te quiero muchísimo. También te dedico esta tesis.

A mi madre. El sol de mi vida, la fuente de mi ser. Somos un equipo. El mejor equipo al que nunca podré pertenecer. Gracias por haberme dado la vida y por haberme puesto en el camino. Llegué al mundo a los mejores brazos y al corazón más puro y noble que jamás conoceré. Esta tesis es para ti. Esta tesis son tus raíces, tus esfuerzos, tu trabajo, tu lucha, tu sonrisas, tus caricias, tus abrazos, tus besos, tus llamadas, tus preocupaciones, la primera vez que te disfrazaste de rey mago, los viajes juntos, las canciones, las conversaciones. Gracias mamá por todo lo que has conseguido y por haberme convertido en el hombre que soy. En nosotros está la magia y el vínculo. Esta tesis sale de ti. Es tu creación. Te quiero siempre mamá.

*Quando aspiro en tu huerta  
los azahâres,  
su aroma en mí despierta  
dulces cantares...  
¡Ay huerta mía,  
huerta de Murcia, germen  
de poësía!...*

*Tierra en que mi existencia  
tuvo su aurora...  
tierra donde mi ausencia  
mi madre llora...  
¡Tierra bendita  
cuyo santo recuerdo  
mi pecho agita!...*

*Acequias y brazales,  
frescos quijeros,  
sendas entre rosales  
y limoneros  
verdes panizos,  
rumores misteriosos  
de los carrizos...*

*Tierra de perennales  
frescos verdores,  
siempre primaverales  
y encantadores...  
valle murciano  
que alegra el canto dulce  
de los huertanos...*

*Tierra de mis albores...  
encantadora  
tierra de mis amores,  
donde se encuentra  
la madre mía...  
¡huerta de Murcia, germen  
de poësía!*

*"A Murcia"  
Vicente Medina*



