



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA

**Papel de la Proteína de Supervivencia de
la Motoneurona (SMN) en la
Maduración Sináptica**

TESIS DOCTORAL
JULIO FRANCO ESPÍN
SEVILLA, 2021



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Avda. Sánchez Pizjuán, 4. 41009 Sevilla

Dña. Lucía Tabares Domínguez, Catedrática de Fisiología del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que D. Julio Franco Espín ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “PAPEL DE LA PROTEÍNA DE SUPERVIVENCIA DE LA MOTOREURONA (SMN) EN LA MADURACIÓN SINÁPTICA”, que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Lucía Tabares Domínguez

Sevilla a 5 de mayo de 2021

El presente trabajo ha sido financiado por las siguientes entidades públicas y privadas:

Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto BFU2013-43763-P

Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto BFU2016-78934-P

Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto PID2019-110272-R

Fundación Tatiana Pérez de Guzmán El Bueno

SMA-Europe

Asociación El Camino de Elena

Cuando empecé mi TFG sobre la AME, ni se me pasaba por la cabeza poder disfrutar de los entresijos de la labor científica ni acabar realizando una tesis doctoral sobre el tema. Sin embargo, como dicen algunos: “la ciencia no se hace sola, ahí que hacerla”. Y así hice. Tras casi cinco años, a pesar de las dificultades, de la falta de financiación, de largas jornadas pegado al microscopio o de experimentos que no salían he podido publicar esta tesis que, espero, disfruten los lectores. Y esto ha sido posible por la colaboración y apoyo de muchos que, en mayor o menor medida, directa o indirectamente, han contribuido a que este trabajo saliese adelante y a los que estaré eternamente agradecido.

En primer lugar, gracias Lucía, mi directora Por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de tu grupo. Por el apoyo que me has brindado estos años. Por haberme formado en la ciencia, no solo técnicamente, sino en valores como la honestidad, la constancia y la perseverancia. Por la confianza y el apoyo cuando las cosas no salían. De nuevo, gracias.

A mi grupo, por el apoyo y los buenos momentos que hemos compartido estos años, gracias. A Rocío y Mario, por enseñarme todo lo que sé. Sin vosotros, esta tesis no podría haber sido posible. A Saravanan, por esas tostadas matutinas y esos cafés a media tarde. Y por toda la ayuda brindada tanto a mí como a mis compañeros. También a Ana, Albert y Andrea. Y, como no, a Mara, nuestra técnico, por enseñarme sobre la PCR y sobre la vida.

Debo agradecer también al Prof. Michael Sendtner por haberme dado la oportunidad de formarme en la técnica FiSH en su laboratorio, así como por sus críticas constructivas al presente trabajo. A Mehri y Chunchu, por arrojarme en Wurzburg y enseñarme las bases de los cultivos de motoneuronas y de la hibridación *in situ*. Os deseo lo mejor y os estaré siempre agradecido. Agradecer también a los profesores Armengol, por su ayuda y formación en microscopía electrónica y su colaboración en el estudio de los ribosomas, y Calderó, por la colaboración en los estudios en TA y la revisión crítica del trabajo. Tengo que agradecer también a la empresa Izasa, por cedernos el STEDYCON para los experimentos de superresolución, y a las asociaciones de pacientes y familiares. En especial, a la Asociación El Camino de Elena, no solo por la financiación recibida, sino fundamentalmente por el apoyo necesario que brindan a las familias.

También querría agradecer a mis compañeros del departamento, por hacer el día a día mas llevadero y por estar ahí para cualquier duda. A María, Mari, Eva, Juancho,

Elisa, Jose Antonio, Judit, Ale. Gracias. A Mariluz y Juanjo, por vuestros consejos sobre inmunotransferencia. A Itziar e Ignacio, por su ayuda en el animalario. También a los profesores del departamento, especialmente a Guillermo por sus sabios consejos y ayuda, así como por el asesoramiento técnico y el macro para la descomposición de EPP complejos. A Loli, Carlos y Fernando, por hacer la burocracia mucho más sencilla.

Gracias a mi gente del barrio. A Jose, Pakuky, Gonzalo, Guille, Antonio, Elena, Paco, Alicantino, Cuenca, Salas y Jona. Por las quedadas en el Rupe o en san Joaquín que me daban la vida. Porque siempre estáis ahí y sois lo más grande.

Y, como no podía ser de otra manera, a mi familia. Os lo debo TODO. Por hacerme ser como soy. Por el amor que me habéis dado. Por los valores que me habéis inculcado. Por el apoyo incondicional. A mis padres, Luis y Josefina. A mis hermanos, Antonio y Luis. Y a Sara. Os quiero.

PERTENENCIA A GRUPOS DE INVESTIGACIÓN

- Grupo BIO209: Neurotransmisión y sinaptopatologías. Universidad de Sevilla

CONTRATOS ASOCIADOS A PROYECTOS

- 2016-2017: contrato de investigador asociado al proyecto “Variabilidad funcional de los terminales nerviosos motores y vulnerabilidad sináptica AME”. Ministerio de Economía y competitividad BFU2013-43763-P
- 2017-2019: contrato de investigador asociado al proyecto “Regulación de la expresión de SV2B y Sinaptotagmina 1-2 y su alteración en la Atrofia Muscular Espinal”. Ministerio de Economía y competitividad BFU2016-78934-P
- 2020: contrato de investigador asociado al proyecto “Spinal Muscular Atrophy. Mechanism implicated in the perturbation of calcium homeostasis and essay of a new therapeutic molecular target”. SMA Europe 2019/1007
- 2020: contrato de investigador asociado al proyecto “Modelo múrido de Atrofia Muscular Espinal”. SMA Europe 2019/1007 y El camino de Elena

ESTANCIAS EN INSTITUCIONES DE INVESTIGACIÓN EXTRANJERAS

- Marzo 2018 – Junio 2018: Instituto de Neurobiología Clínica, Universidad de Würzburg, Alemania. Tutorizado por el Prof. Michael Sendtner.

PUBLICACIONES

- Tejero, R., Lopez-Manzaneda, M., **Franco-Espín, J.**, & Tabares, L. (2018) Maturation and heterogeneity of vertebrate motor synapses. *Curr. Opin. Physiol.*, **4**, 1–6.
- Tejero, R., Balk, S., Appenzeller, S., Tabares, L., Jablonka, S., Tejero, R., Balk, S., **Franco-Espín, J.**, Ojeda, J., Hennlein, L., Drexler, H., Dombert, B., Clausen, J., Torres-benito, L., Saal-bauernschubert, L., Blum, R., Briese, M., Appenzeller, S., Tabares, L., & Jablonka, S. (2020) R-Roscovitine Improves Motoneuron Function in Mouse Models for Spinal Muscular Atrophy R-Roscovitine Improves Motoneuron Function in Mouse Models for Spinal Muscular Atrophy. *iScience*, **23**, 100826.

- Lopez-Manzaneda, M., **Franco-Espin, J.**, Tejero, R., Cano, R., & Tabares, L. (2021) Calcium is Reduced in Presynaptic Mitochondria of Motor Nerve Terminals during Neurotransmission in SMA Mice. *Hum. Mol. Genet.*, doi: 10.1093/hmg/ddab065.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

Comunicaciones Orales

- **Franco J.**, Tabares L. Role of SMN in synapse maturation. Workshop “Synapse Formation, Specification and Elimination: from Molecules to Circuits”. Baeza, España. Septiembre, 2017

Posters

- **Franco J.**, Tabares L. Estructural analysis of SMN granules in motor axons and presynaptic nerve terminals. 16th Congress of the Spanish Biophysical Society. Sevilla (España). Junio 2017
- **Franco J.**, Tabares L. Role of SMN in synapse maturation. Workshop “Synapse Formation, Specification and Elimination: from Molecules to Circuits”. Baeza, España. Septiembre 2017
- **Franco J.**, Tabares L. SMN colocalizes with the cytoskeleton in motor axons and nerve terminals. International Scientific Congress on Spinal Muscular Atrophy. Cracovia, Polonia. Enero 2018
- **Franco-Espín J.**, Tabares L. Superresolution visualization of SMN particles in mouse motor nerve terminals. 23rd International SMA Researcher Meeting. Anaheim, California (EEUU). Junio 2019

Índice

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	7
SUMMARY	10
INTRODUCCIÓN	13
1. La Atrofia Muscular Espinal (AME)	14
1.1. Tipos clínicos de AME.....	15
1.2. Genética de la AME	16
2. La proteína SMN	19
2.1. Estructura	19
2.2. Isoformas de SMN	22
2.3. Funciones y localizaciones de la proteína SMN	24
3. Impacto de la deficiencia de SMN en el sistema motor.....	41
3.1. Patología de la motoneurona en la AME	41
3.2. ¿Es la AME una enfermedad de la motoneurona inferior o una enfermedad del sistema motor?.....	43
3.3. Patología de la NMJ	44
4. Perspectiva terapéutica.....	47
4.1. Incremento de los niveles de SMN	47
4.2. Terapias complementarias.....	50
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	52
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1. Modelos animales	56
1.1. Características de los modelos murinos de AME.....	57
1.2. Genotipado de las líneas experimentales	61
1.3. Fenotipado	68

2. Preparaciones neuromusculares y espinales	69
2.1. Materiales y soluciones de extracción y registro	69
2.2. Músculo elevador largo de la oreja	71
2.3. Músculo transverso del abdomen	72
2.4. Médula espinal	74
3. Inmunohistoquímica	76
3.1. Preparaciones neuromusculares	76
3.2. Médula espinal	77
4. Inmunotransferencia de proteínas	81
4.1. Dispositivo experimental.....	81
4.2. Procedimiento experimental.....	81
5. Hibridación <i>in situ</i>	85
6. Registros Electrofisiológicos	88
6.1. Dispositivo experimental.....	88
6.2. Procedimiento experimental.....	90
6.3. Análisis de los registros electrofisiológicos	92
7. Registros de imagen dinámica	96
7.1. Dispositivo experimental.....	96
7.2. Registro en tiempo real de exo-endocitosis.....	97
7.3. Registros en tiempo real del potencial de membrana mitocondrial	98
8. Adquisición y Análisis de Imágenes.....	100
8.1. Microscopía láser confocal.....	100
8.2. Microscopía láser de superresolución	103
8.3. Análisis de imágenes	105
9. Análisis Estadístico	107
9.1. Estudio de la normalidad y de la homogeneidad de varianzas.....	107

9.2. Estudio de las diferencias entre grupos experimentales para variables cuantitativas.....	107
RESULTADOS	110
1. Análisis de las características de la expresión de SMN en axones y terminales motores de ratones silvestres y modelos de AME. Posible relación de SMN con el citoesqueleto y la maquinaria de traducción local	111
1.1. Expresión de la proteína Smn endógena y SMN heteróloga en axones y terminales motores	111
1.2. Relación entre SMN y el citoesqueleto	126
1.3. Estudio de proteínas potencialmente asociadas a SMN	139
1.4. Identificación de ARNm en el axón y la NMJ	147
1.5. Los terminales presinápticos motores contienen ribosomas y polirribosomas durante el periodo de maduración postnatal.....	154
2. Afectación de la endocitosis y de las mitocondrias presinápticas en la AME.....	156
2.1. Caracterización funcional del modelo animal	157
2.2. La liberación de neurotransmisores está alterada en los ratones deficientes en SMN del modelo Taiwanés	160
2.3. El ciclo vesicular exo-endocítico está alterado en los ratones deficientes en SMN del modelo Taiwanés	164
2.4. Las mitocondrias son esenciales para la exo-endocitosis en los terminales nerviosos motores de la AME	167
2.5. La actividad eléctrica en los terminales AME no produce despolarización de la mitocondria.....	171
3. Estudio de la modulación de los canales de calcio en terminales motores AME .	174
3.1. Efecto de GV-58 sobre la neurotransmisión en el terminal nervioso motor..	174
3.2. GV-58 incrementa los eventos de liberación tras el estímulo mediante fusiones asincrónicas	178
3.3. Los terminales motores AME responden a la exposición a GV-58 de forma similar a los terminales controles	180

DISCUSIÓN.....	183
1. Función periférica de SMN en las motoneuronas.....	185
1.1. Función de SMN en el axón.....	185
1.2. Función de SMN en el terminal motor.....	189
1.3. Regulación temporal de la expresión de SMN.....	190
2. Impacto de la sobreexpresión de SMN y SMN Δ 7.....	191
3. Alteraciones funcionales del terminal motor en la AME.....	193
3.1. Afectación de la exo-endocitosis.....	193
3.2. Defectos en la homeostasis mitocondrial.....	194
3.3. Perspectiva terapéutica de los agonistas de los VGCC: GV-58.....	196
CONCLUSIONES.....	198
CONCLUSIONS.....	201
BIBLIOGRAFÍA.....	203
ANEXOS.....	228
Anexo I: Datos técnicos de los cebadores empleados.....	229
Anexo II: Datos experimentales.....	230

Abreviaturas

- 3'-UTR** – Región no traducida tres prima (del inglés “*3'-UnTranslated Region*”)
- 4-AP** – 4-Aminopiridina
- $\Delta\Psi_m$** – Potencial de membrana mitocondrial
- aa** – Aminoácido
- ACh** – Acetilcolina (del inglés “*AcetylCholine*”)
- AChR** – Receptor de acetilcolina (del inglés “*AcetylCholine Receptor*”)
- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- AME** – Atrofia Muscular Espinal
- ANOVA** – Análisis de varianza (del inglés “*ANalysis Of VAriance*”)
- ARNm** – Ácido ribonucleico mensajero
- ARNlnc** – ARN largo no codificante
- ARNpn** – Ácido ribonucleico pequeño nuclear
- ARNpno** – Ácido ribonucleico pequeño nucleolar
- ARNr** – Ácido ribonucleico ribosómico
- ARNt** – Ácido ribonucleico transferente
- ASO** – Oligonucleótido antisentido (del inglés “*AntiSense Oligonucleotid*”)
- ATP** – Adenosina trifosfato (del inglés “*Adenosine TriPhosphate*”),
- BDNF** – Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés “*Brain-Derived Neurotrophic Factor*”)
- BHE** – Barrera hematoencefálica
- BiFC** – Complementación bifluorescente (del inglés “*BiFluorescence Complementation*”)
- BSA** – Albúmina de suero bovino (del inglés “*Bovine Serum Albumin*”)
- BTX-rho** – Bungarotoxina conjugada con rodamina
- CB** – Cuerpos de Cajal (del inglés “*Cajal's Bodies*”)
- CCCP** – Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (del inglés “*Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl hydrazone*”)
- CdK-5** – Quinasa dependiente de ciclina 5 (del inglés “*Cyclin-Dependent Kinase-5*”)
- ChAT** – Acetil-colin transferasa (del inglés “*Choline AcetylTransferase*”)
- COP1** – Proteína del complejo de cubierta 1 (del inglés “*Coat Complex Protein 1*”)
- Cpg15** – Proteína candidata a plasticidad 15 (del inglés “*Candidate plasticity gene 15*”)
- DIG** – Digoxigenina
- DIV** – Días *in vitro*

DMSO – Dimetilsulfóxido

dNTP – Desoxinucleósido trifosfato (del inglés “*DeoxiNucleoside TriPhosphate*”)

EGFP – Proteína verde fluorescente potenciada (del inglés “*Enhanced Green Fluorescent Protein*”)

EDTA – Ácido etildiaminotetraacético (del inglés “*EthylDiaminoTetraAcetic acid*”)

ELA – Esclerosis Lateral Amiotrófica

EMA – Agencia europea del medicamento (del inglés “*European Medicament Agency*”)

EPP – Potencial de placa terminal (del inglés “*End-Plate Potential*”)

ESE – Potenciador del corte y empalme exónico (del inglés “*Exonic Splicing Enhancer*”)

EV – Vector vacío (del inglés “*Empty Vector*”)

EWS – Proteína del sarcoma de Ewing (del inglés “*EWing Sarcoma*”)

FDA – Administración de alimentos y medicamentos (del inglés “*Food and Drugs Administration*”),

FISH – Hibridación fluorescente *in situ* (del inglés “*Fluorescent In Situ Hybridization*”)

FMRP – Proteína del retraso mental asociado a X frágil (del inglés “*Frágil-X Mental Retardation Protein*”)

FWHM – Ancho completo a la mitad del máximo o ancho-un-medio (del inglés “*Full Width at Half Maximum*”)

GAP43 – Proteína 43 asociada al crecimiento (del inglés “*Growth-Associated Protein 43*”)

GFP – Proteína verde fluorescente (del inglés “*Green Fluorescent Protein*”)

GPx1 – Glutation peroxidasa 1

HM – Medio de hibridación (del inglés “*Hybridization Media*”)

hnRNP R – Ribonucleoproteína heterogénea nuclear R (del inglés, “*heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein R*”)

HRP – Peroxidasa del rábano (del inglés “*HorseRadish Peroxidase*”)

ICQ – Inmunocitoquímica

IGF1 – Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (del inglés “*Insulin-like Growth Factor 1*”)

IHQ – Inmunohistoquímica

IMP1 – Proteína de unión al ARNm de IGF2 (del inglés, “*IGF2 mRNA-binding protein 1*”)

ISS – Silenciador del corte y empalme intrónico (del inglés “*Intronic Splicing Silencer*”)

LAL – Elevador largo de la oreja (del latín “*Levator auris longus*”)

LNA – Ácido nucleico bloqueado (del inglés “*Locked Nucleic Acid*”)

- Lsm** – Proteína tipo Sm (del inglés “*Sm-Like*”)
- MAP1B** – Proteína asociada a microtúbulos 1B (del inglés “*Microtubules-Associated Protein 1B*”)
- MAP2** – Proteína asociada a microtúbulos 2 (del inglés “*Microtubules-Associated Protein 2*”)
- MAPK** – Proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés “*Mitogene-Activated Protein Kinase*”)
- mEPP** – Potencial de placa terminal en miniatura (del inglés “*miniature End-Plate Potential*”)
- miARN** – Micro ácido ribonucleico
- MT** – Microtúbulos
- NA** – Apertura numérica (del inglés “*Numerical Aperture*”)
- NAIP** – Gen de la proteína inhibitoria de apoptosis de la familia NLR (del inglés “*NLR-family Apoptosis Inhibitory Protein*”)
- NF-M** – Neurofilamentos, subunidad mediana
- NMJ** – Unión neuromuscular (del inglés “*NeuroMuscular Junction*”)
- OCT** – Compuesto de temperatura de corte óptima (del inglés “*Optimal Cutting Temperature*”)
- OIA** – Oblicuo interno del abdomen (del latín “*Obliquus Internus Abdominis*”)
- PA** – Potencial de acción
- PCR** – Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “*Polimerase Chain-Reaction*”)
- PBS** – Solución salina tamponada con fosfato (del inglés “*Phosphate-Buffered Saline*”)
- PFA** – Paraformaldehído
- pICln** – Proteína regulatoria de la conductancia del cloruro
- PLP** – Periodato-lisina-paraformaldehído
- PRMT** – Proteína arginina-metiltransferasa (del inglés “*Protein arginine N-MethylTransferase*”)
- PSF** – Función de dispersión de puntos (del inglés “*Point Spread Function*”)
- PVDF** – Difluoruro de polivinilideno (membrana) (del inglés “*PolyVinylidene DiFluoride*”)
- QC** – Contenido cuántico (del inglés “*Quantum Content*”)
- RIPA** – Tampón para ensayo de radioinmunoprecipitación (del inglés “*RadioImmunoPrecipitation Assay*”)
- RNP** – Ribonucleoproteína
- mRNP** – Ribonucleoproteína mensajera (del inglés “*messenger RiboNucleoProtein*”)

scaRNP – Ribonucleoproteína pequeña específica de los cuerpos de Cajal (del inglés “*small cajal bodies-specific RiboNucleoProtein*”)

snRNP – Ribonucleoproteína pequeña nuclear (del inglés “*small nuclear RiboNucleoProtein*”)

snoRNP – Ribonucleoproteína pequeña nucleolar (del inglés “*small nucleolar RiboNucleoProtein*”)

RBP – Proteína de unión a ARN (del inglés “*RNA-Binding Protein*”)

ROI – Región de interés (del inglés “*Region Of Interest*”)

SBP2 – Proteína de unión a SECIS 2 (del inglés, “*SECIS-Binding Protein 2*”)

scAAV – del inglés “self-complementary Adeno-Associated Vector”, vector adeno-asociado autocomplementario

SDS – dodecilsulfato de sodio (del inglés “*Sodium DodecilSulfate*”)

SFE – Solución fisiológica extracelular

SG – gránulos de estrés (del inglés “*Stress Granules*”)

Sm – Antígeno de Smith

SMN – Proteína de supervivencia de la motoneurona humana (del inglés “*Survival of Motor Neuron*”)

Smn – Proteína de supervivencia de la motoneurona no humana (ratón, pez cebra, etc.)

SMN1 – Gen de supervivencia de la motoneurona 1

SMN2 – Gen de supervivencia de la motoneurona 2

SNC – Sistema nervioso central

SNP1 – Esnurportina 1

SSC – Solución salina con citrato de sodio (del inglés “*Saline-Sodium Citrate*”)

STD – Depresión a corto plazo (del inglés “*Short-Term Depression*”)

STED – Depleción de emisión estimulada (del inglés “*STimulated Emission Depletion*”)

SV2 – Proteína de la vesícula sináptica 2 (del inglés “*Synaptic Vesicle 2*”)

Syt1 – Sinaptotagmina 1

Syt2 – Sinaptotagmina 2

TBS – Solución salina tamponada con Tris (del inglés “*Tris-Buffered Saline*”)

TGS1 – Trimetilguanosina sintasa 1

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

TVA – Transverso del abdomen (del latín “*TransVersus Abdominis*”)

VGCC – Canal de calcio activado por voltaje (del inglés “*Voltage-Gated Calcium Channel*”)

vGLUT2 – Transportador vesicular de glutamato 2 (del inglés “*vesicular GLUtamate Transporter 2*”)

WB – Inmunotransferencia (del inglés “*Western Blot*”)

ZPR1 – Proteína dedo de zinc 1 (del inglés, *Zinc Protein Finger 1*)

Resumen

La atrofia muscular espinal (AME), la causa genética más frecuente de mortalidad infantil, es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de neuronas motoras espinales. La AME causa debilidad muscular progresiva y parálisis y se debe a la pérdida o mutación de *SMN1*, que codifica la supervivencia de la proteína de la neurona motora (SMN). SMN se expresa de forma ubicua y participa en múltiples procesos del metabolismo del ARN. Aunque aún no se ha demostrado su función fisiológica en axones y terminales presinápticos, diferentes estudios *in vitro* sugieren que participa en la síntesis local de proteínas. La caracterización de las alteraciones estructurales, funcionales y moleculares en modelos de ratón SMA ha contribuido en gran medida a la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad.

El objetivo del presente trabajo ha sido doble. Primero, estudiar la organización espacial y temporal de SMN en axones motores y terminales y, segundo, investigar los mecanismos implicados en la disfunción sináptica de la unión neuromuscular (NMJ). Nuestros resultados revelan la existencia de gránulos de proteína SMN endógena y heteróloga a lo largo de los axones y dispuestos de manera ordenada dentro de el terminal nervioso motor. Demostramos que los gránulos de SMN coexisten con dos elementos de la maquinaria de síntesis de proteínas en el preterminal: los ribosomas y el ARNm. En ratones WT, los gránulos axonales y preterminales disminuyen durante las dos primeras semanas de vida, volviéndose imperceptibles en la edad adulta. Sin embargo, la expresión heteróloga de SMN permanece constante durante este período. Así mismo, nuestros resultados revelan una posible asociación entre los gránulos y el citoesqueleto, especialmente con los NF. A medida que avanza la enfermedad, SMN y NF forman agregados en axones y terminales, posiblemente contribuyendo al colapso del terminal nervioso. Proponemos que SMN participa en la maduración de la sinapsis regulando el transporte y el metabolismo del ARNm en este compartimento.

En la segunda parte de nuestro trabajo, investigamos las alteraciones funcionales del terminal motor en la AME mediante el análisis electrofisiológico de la neurotransmisión y registros de imagen dinámica de la exo-endocitosis y la función mitocondrial. Nuestros resultados muestran que la mitocondria es fundamental para mantener la neurotransmisión y reciclar las vesículas sinápticas, tanto en controles como en mutantes, y que la producción de ATP por la vía glucolítica no juega un papel importante en esta sinapsis. Finalmente, hemos investigado la capacidad de GV-58, un agonista de los canales de calcio dependiente del voltaje, para aumentar la liberación de

neurotransmisores. Encontramos que GV-58 prolonga la duración de los potenciales postsinápticos en ratones SMA de una manera dependiente de la dosis.

Summary

Spinal muscular atrophy (SMA), the most frequent genetic cause of infant mortality, is a neurodegenerative disease characterized by spinal motoneuron loss. SMA causes progressive muscle weakness and paralysis, and it is due to the loss or mutation of the *SMN1*, which encodes the survival of motor neuron (SMN) protein. SMN is ubiquitously expressed and participates in multiple processes of RNA metabolism. Although its physiological function in axons and presynaptic terminals has not been demonstrated yet, different *in vitro* studies suggest that it participates in local protein synthesis. The characterization of the structural, functional, and molecular alterations in SMA mouse models contributes highly to understanding the disease's pathophysiology.

The objective of the present work has been double. First, to study the spatial and temporal organization of SMN in motor axons and nerve terminals and, second, to investigate the mechanisms involved in the synaptic dysfunction of the neuromuscular junction (NMJ). Our results reveal both endogenous and heterologous SMN protein granules distributed along the axons and arranged in an orderly manner inside the nerve motor terminal. We demonstrate that SMN granules coexist with two elements of the protein synthesis machinery at the preterminal: ribosomes and mRNA. In WT mice, the number of Smn granules decreases during the first two weeks of life, becoming imperceptible in adulthood. However, the heterologous expression of the SMN protein in the transgenic mice remains constant during this period. Likewise, our results reveal a potential association between Smn-SMN granules and the cytoskeleton, especially with NFs. As the disease progresses in the mouse SMA model, SMN and NFs form aggregates in axons and terminals, possibly contributing to the nerve terminal collapse. We propose that SMN participates in synapse maturation by regulating the transport to and metabolism of the mRNA at this compartment

In the second part of our work, we investigated the functional alterations of the motor nerve terminal in SMA. We characterized neurotransmission defects with electrophysiological techniques and exo- endocytosis and mitochondrial homeostasis alterations by dynamic imaging. Our results show that mitochondrial activity is critical for maintaining neurotransmission and recycling synaptic vesicles, both in controls and in mutants. ATP production by the glycolytic pathway does not play an important role in this synapse. Finally, we have investigated the capability of GV-58, a voltage-dependent calcium channel agonist, to increase neurotransmitter release. We found that GV-58

prolongs the duration of the post-synaptic potentials in SMA mice in a dose-dependent manner.

Introducción

1. La Atrofia Muscular Espinal (AME)

La Atrofia Muscular Espinal (AME) es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva caracterizada por la degeneración de α -motoneuronas del tronco encefálico y de la medula espinal. Desde el punto de vista clínico se caracteriza por debilidad y atrofia muscular, generalmente severa, de predominio axial y proximal. El gen responsable de la enfermedad se denomina *SMN1* y fue identificado en 1995 (Lefebvre *et al.*, 1995). Distintas alteraciones en *SMN1* dan lugar a la deficiencia en una proteína ubicua denominada SMN o proteína de supervivencia de motoneuronas.

Desde que hace 25 años SMN se identificó en el núcleo celular en asociación con los Cuerpos de Cajal (CB) (Liu & Dreyfuss, 1996) se ha desarrollado una vasta literatura que indica que SMN ejerce un papel central en el metabolismo del ARN a distintos niveles (Singh *et al.*, 2017). Por ejemplo, a nivel de la transcripción interacciona con la ARN polimerasa II, evitando la formación de híbridos ADN-ARN. Así mismo, regula indirectamente la maduración de los pre-ARN puesto que dirige la formación de distintos tipos de ribonucleoproteínas (RNP) esenciales en este proceso, como las nucleares pequeñas (snRNP) o nucleolares pequeñas (snoRNP). Por otro lado, regula la estabilidad y tráfico de los ARNm participando en la formación de los gránulos de estrés y de las RNP mensajeras (mRNP). Recientemente, además, se ha demostrado que participa en la traducción a través de su interacción con los ribosomas. Aunque estas funciones son esenciales para la supervivencia de todas las células y aunque las neuronas pueden requerir una mayor actividad e integridad del metabolismo de los ARN, aún no está claro por qué las motoneuronas son tan sensibles a niveles bajos de SMN.

En el último lustro, con el desarrollo de las técnicas ómicas, distintos grupos, entre los que destacan los dirigidos por el Prof. Sendtner, el Prof. Rossoll y la Prof. Viero, han postulado que SMN es necesaria para la síntesis de un subgrupo de ARNm y proteínas de especial importancia en las motoneuronas, como los relacionados con el desarrollo del sistema nervioso, el metabolismo energético y la función sináptica.

Estos y otros puntos esenciales para comprender la etiología, fisiopatología, clínica y terapia de la AME se detallarán y discutirán en los siguientes apartados.

1.1. Tipos clínicos de AME

Clínicamente, la AME se engloba dentro de las enfermedades de la motoneurona y mayoritariamente se manifiesta en edad infantil. Se caracteriza por una pérdida de las motoneuronas α del asta anterior de la médula espinal y del tronco encefálico. Cursa con debilidad muscular de predominio axial y proximal (Crawford & Pardo, 1996). Se han descrito 5 tipos clínicos de AME basados en la edad de aparición de los síntomas y el grado de disfunción motora (Crawford & Pardo, 1996; Zerres *et al.*, 1997; Dubowitz, 1999; D'Amico *et al.*, 2011; Markowitz *et al.*, 2012; Arnold *et al.*, 2015; Ojala *et al.*, 2021)

- AME tipo 0: Es la forma de clínica más grave y de aparición más precoz. La sintomatología se inicia prenatalmente y se manifiesta por una disminución importante de la actividad motora al nacimiento (síndrome del bebé flácido), y suelen requerir soporte respiratorio al nacimiento. Su esperanza de vida no supera los 6 meses.
- AME tipo I: También denominada enfermedad de Werdnig-Hoffmann. Es la forma más común. Típicamente aparecen los signos propios de la enfermedad entre el nacimiento y los 6 meses de edad y se manifiesta clínicamente con una sintomatología motora grave, siendo incapaces de sentarse sin apoyos. Suelen tener una esperanza de vida de 2 años.
- AME tipo II: También llamada enfermedad de Kugelberg-Welander, aparece entre los 7 y los 18 meses de edad, siendo llamativo el retraso en el desarrollo motor. Aunque son incapaces de andar sin ayuda, pueden sentarse sin apoyos e incluso ponerse en pie. Su esperanza de vida supera los 2 años, aunque raramente alcanzan la edad adulta.
- AME tipo III: El inicio de la clínica se produce después de los 18 meses de edad. El espectro clínico es muy amplio, aunque característicamente adquieren la capacidad de andar sin ayuda. Sin embargo, conforme la enfermedad progresa los pacientes suelen perder esta capacidad. Presentan una reducción de la esperanza de vida.
- AME tipo IV: pacientes con inicio de los síntomas en la edad adulta y con un curso leve pero progresivo. No presentan una reducción de la esperanza de vida.

La AME tiene una incidencia de un caso por cada 6000-10000 nacidos vivos, siendo la causa genética de mortalidad más frecuente en la primera infancia (Crawford & Pardo, 1996; Markowitz *et al.*, 2012). Además, se estima una prevalencia de portadores del 2% (Crawford & Pardo, 1996).

1.2. Genética de la AME

El gen cuyas mutaciones son causantes de la AME fue identificado en 1995 por Lefebvre y colaboradores (Lefebvre *et al.*, 1995) y fue denominado *SMN* (gen de supervivencia de la motoneurona, del inglés *Survival of Motor Neuron*). *SMN* presenta dos o más copias en el genoma humano, producto de una duplicación e inversión del locus en que se encuentra (Rochette *et al.*, 2001). Todas las copias se localizan en el cromosoma 5q11.2-13.3 (Brzustowicz *et al.*, 1990), presentando esta región un gen con localización telomérica o *SMN1* y uno o varios genes centroméricos o *SMN2* (Fig. 1A). Aunque se han identificado genes homólogos a *SMN1* en una amplia variedad de organismos eucariotas, como en mamíferos, *C. elegans* o *D. melanogaster*, el gen *SMN2* es exclusivo de humanos (Rochette *et al.*, 2001).

SMN1 y *SMN2* son prácticamente idénticos, contienen 9 exones (1, 2a, 2b, 3-8) y tienen un tamaño aproximado de 27 kb (Bürglen *et al.*, 1996) y solo difieren en 5 nucleótidos (Fig 1B). De estos, únicamente la transición citosina-timina presente en el exón 7 (840C > T) tiene un impacto funcional relevante (Lorson *et al.*, 1999; Monani *et al.*, 1999; Lorson & Androphy, 2000). Esta transición, aunque no altera la secuencia de aminoácidos, afecta severamente al proceso de corte y empalme necesario para la maduración del transcrito primario (Fig. 1B). 840C se inscribe en una secuencia potenciadora del corte y empalme que favorece la inclusión del exón 7, por lo que el transcrito de *SMN1* incluye este exón (*SMN^{fl}*). En cambio, la sustitución por timina presente en *SMN2* genera una secuencia silenciadora de dicho proceso que incrementa la probabilidad de un corte y empalme alternativo del exón 7. Como resultado, el principal producto de *SMN2* es un ARNm que carece de este exón (*SMN Δ 7*) (Lorson *et al.*, 1999; Monani *et al.*, 1999), aunque también produce una pequeña cantidad, cercana al 10%, de

transcrito con la secuencia completa (Lorson & Androphy, 2000; Burnett *et al.*, 2009; Cho & Dreyfuss, 2010).

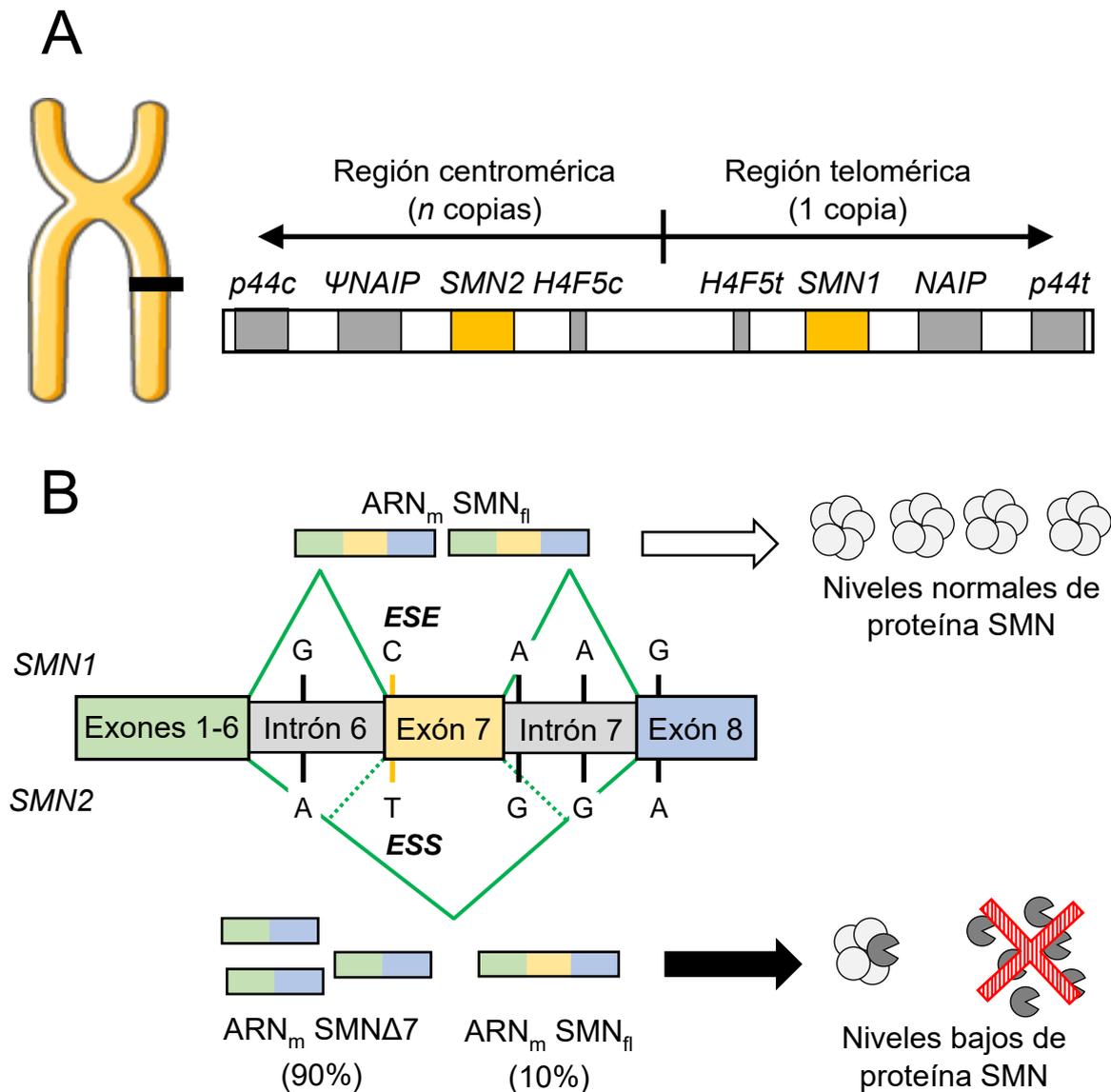


Figura 1. Localización cromosómica y corte y empalme de los genes *SMN1* y *SMN2*.
A. Representación esquemática de la región 5q11.2-13.3. Los 4 genes presentes en la región telomérica del locus (*H4F5t*, *SMN1*, *NAIP* y *p44t*) se encuentran duplicados un número variable de veces en la región centromérica. Modificada de Wirth, 2000. **B.** La transición citosina-timina al inicio del exón 7 sustituye una secuencia potenciadora de la inclusión del exón en el transcrito final (ESE, *Exonic Splicing Enhancer*) por una silenciadora (ESS, *Exonic Splicing Silencer*). En consecuencia, la mayor parte de los transcritos de *SMN2* sufren un corte y empalme alternativo en su proceso de maduración que conlleva la pérdida del exón 7, aunque un pequeño porcentaje sí mantiene la secuencia completa. Se cree que las proteínas sintetizadas a partir de las secuencias carentes del exón 7 pueden ser rápidamente degradadas o bien oligomerizar con la proteína SMN y formar complejos funcionales. Modificada de Burghes & Beattie, 2009.

Cerca del 95% de los pacientes con AME presentan una alteración homocigótica del gen *SMN1*, bien debido a deleciones de los dos alelos o bien a una deleción de un alelo junto con una conversión génica del otro alelo de *SMN1* en *SMN2* (Lefebvre *et al.*, 1995, 1998). En algunos casos (3% de los afectados), la enfermedad resulta de una deleción heterocigótica de un alelo de *SMN1* y mutaciones intragénicas sutiles en el otro alelo (Wirth, 2000; Burghes & Beattie, 2009; Butchbach, 2016).

En cualquier caso, puesto que la ausencia total de proteína SMN implica letalidad embrionaria (Schrank *et al.*, 1997; Monani, Coover, *et al.*, 2000; Monani, Sendtner, *et al.*, 2000), al menos una copia de *SMN2* está siempre presente en los pacientes. Además, *SMN2* está considerado un gen modificador del fenotipo, puesto que el número de copias del gen correlaciona inversamente con la severidad de la enfermedad (Lefebvre *et al.*, 1997; Butchbach, 2016). Así, la mayoría de pacientes con AME tipo 0 presentan 1 copia de *SMN2*, en el tipo I son comunes las 2 copias, en el tipo II 3 copias, entre 3 y 4 copias en la tipo III y 4 o más copias en el tipo IV. Aunque el efecto modificador puede deberse principalmente a una mayor expresión de proteína completa, el hecho de que la sobreexpresión heteróloga exclusiva de proteína truncada SMN Δ 7 disminuya la severidad del fenotipo *in vivo* en ratones sugiere que puede tener cierta funcionalidad (Le *et al.*, 2005).

2. La proteína SMN

2.1. Estructura

El principal producto del gen *SMN1* es una proteína de 38 kDa compuesta por 294 aminoácidos (aa) denominada SMN o SMN_n. La Figura 2 muestra de forma esquemática su estructura secundaria y terciaria, así como los dominios funcionales y las regiones de interacción con otras proteínas (Singh *et al.*, 2017). Es importante resaltar que se han asociado a la AME mutaciones en todos los dominios, por lo que la estructura completa de la proteína parece ser fundamental para su función en humanos (Howell *et al.*, 2014). A continuación, se describen cada uno de los dominios y sus funciones más relevantes.

Partiendo del extremo N-terminal de la proteína, el primer dominio funcional de SMN es el **dominio K**, llamado así por ser rico en lisina (K). Este dominio se enmarca en los exones 2A y 2B (Lorson & Androphy, 1998) y está implicado en la interacción de SMN con p53 y COPI (Young *et al.*, 2002; Peter *et al.*, 2011). Además, es capaz de interactuar con ARN directamente (Lorson & Androphy, 1998; Bertrand *et al.*, 1999). Gemina 2 también interactúa con este dominio, por lo que se considera clave para la estabilización del complejo que forma SMN con otras proteínas (Fischer *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997). Así mismo, se ha propuesto que el dominio K puede estar implicado en la localización de la proteína en el citosol, puesto que la sobreexpresión en fibroblastos en cultivo de la proteína heteróloga SMN Δ 1-2 restringe su expresión al núcleo (Le *et al.*, 2000).

A continuación, circunscrito principalmente al exón 3, se sitúa el **dominio Tudor**, denominado así por presentar un alto grado de homología con la proteína TUD de *D. melanogaster* (Mushegian *et al.*, 1997; Ponting, 1997; Talbot *et al.*, 1998). Este dominio pertenece a la superfamilia real o “royal superfamily” (denominada así por los “dinásticos” dominios Tudor y plant-Agenet) caracterizados por su capacidad de unión a residuos metilados de lisina y arginina (Maurer-stroh *et al.*, 2003). Los dominios de esta familia están implicados en el metabolismo de ARN y en el reconocimiento de distintas proteínas reguladoras de la expresión génica (Ponting, 1997; Nielsen *et al.*, 2002; Maurer-stroh *et al.*, 2003; Bonasio *et al.*, 2010). Sin embargo, el dominio Tudor de SMN presenta

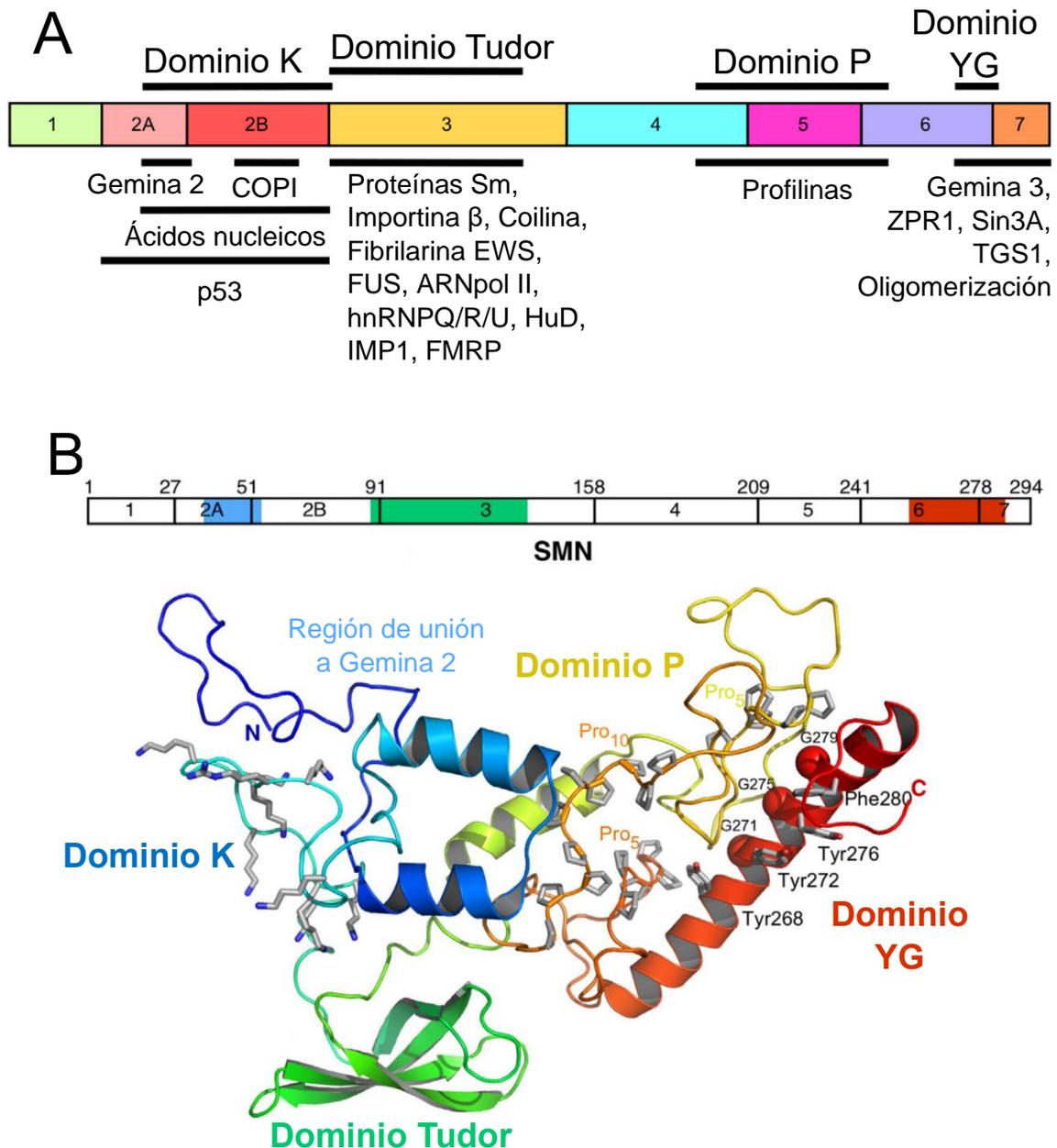


Figura 2. Estructura de la proteína SMN. **A.** Representación esquemática de la proteína SMN. Los números en el cuadro de color indican el exón. Los dominios y las regiones de interacción con proteínas específicas se indican sobre y bajo los cuadros, respectivamente. **B.** El esquema superior representa la estructura primaria de la proteína. Los exones codificantes vienen indicados mediante cajetines, así como el rango de aminoácidos de cada uno (indicado sobre el esquema). La región de unión a Gemina 2 (azul), el dominio Tudor (verde) y el dominio YG (naranja) están representadas mediante un mapa de color. El esquema inferior muestra un modelo tridimensional de la proteína SMN y la localización y estructura de los dominios funcionales de la proteína. La secuencia de aminoácidos viene representada mediante un esquema de colores tipo arcoíris, desde el azul (extremo N-terminal) al rojo (extremo C-terminal). Las cadenas laterales de ciertos aminoácidos se muestran como barras, azules para la lisina y rojas para la tirosina, o esferas, para la glicina. Modificada de Singh *et al.*, 2017.

ciertas diferencias funcionales con el resto de dominios reales. Mientras la mayoría, como Chromo, MBT o Agenet, reconocen residuos de lisina metilados, el dominio Tudor de SMN está subespecializado en el reconocimiento de residuos metilados de arginina. Concretamente, reconoce dimetilargininas simétricas (sDMA, del inglés *symmetric DiMethylArginine*) de los motivos RG/RGG, ricos en arginina (R) y glicina (G), presentes en multitud de proteínas (Friesen & Dreyfuss, 2000; Friesen, Massenet, *et al.*, 2001; Boisvert *et al.*, 2002). A través de esta interacción, SMN reconoce ciertas proteínas implicadas en la regulación génica como la coilina, la fibrilarina, la ARN polimerasa II (Hebert *et al.*, 2001; Pellizzoni, Baccon, *et al.*, 2001; Pellizzoni, Charroux, *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2016). Además, el dominio Tudor es especialmente relevante por tres motivos: (i) múltiples mutaciones productoras de AME se localizan en esta región (Burghes & Beattie, 2009), (ii) interacciona con las proteínas Sm, siendo necesario para la formación de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP, *small nuclear RiboNucleoProtein*) (Buhler *et al.*, 1999; Friesen & Dreyfuss, 2000; Selenko *et al.*, 2001), y (iii) interacciona con múltiples proteínas de unión a ARNm (RBP, *RNA-Binding protein*) como, por ejemplo, HuD, IMP1, la proteína del retraso mental asociado X frágil (FMRP) o hnRNP R (Rossoll *et al.*, 2002; Piazzon *et al.*, 2008; Akten *et al.*, 2011; Dombert *et al.*, 2014; Donlin-Asp *et al.*, 2016, 2017). Más adelante se explicará con mayor detalle el papel funcional de SMN y del dominio Tudor en el metabolismo del ARN y la formación de ribonucleoproteínas (RNP).

El siguiente dominio funcional se denomina **dominio P** por ser rico en prolina (P). Este dominio abarca desde la parte final del exón 4 hasta la región proximal del exón 6 (Giesemann *et al.*, 1999). Está involucrado en la interacción entre SMN y profilina 2. En este dominio también se ubica la región diana de la enzima proteolítica calpaína (Walker *et al.*, 2008; de la Fuente *et al.*, 2019)

Finalmente, en la región distal del exón 6 y la región proximal del exón 7 se ubica el **Dominio YG**, rico en tirosina (Y) y glicina (G) (Talbot *et al.*, 1997). Un gran número de mutación productoras de AME se localizan en este dominio (Wirth, 2000; Sun *et al.*, 2005; Burghes & Beattie, 2009), lo que sugiere que es crítico para la funcionalidad de SMN. Entre otras funciones, el dominio YG está implicado en la interacción de SMN con Gemina 3 y ZPR1 (Charroux *et al.*, 1999; Gangwani *et al.*, 2001, 2005). Sin embargo, la importancia de este dominio radica en dos aspectos interrelacionados: (i) es fundamental

para la oligomerización de SMN y la estabilización de la proteína (Pellizzoni *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2012), y (ii) la exclusión del exón 7 en la transcripción de *SMN2* provoca que esté afectado parcialmente en la isoforma truncada SMN Δ 7. La oligomerización de SMN se produce mediante la formación de una cremallera de glicina entre los dominios YG (Martin *et al.*, 2012) y es esencial para la funcionalidad de SMN puesto que permite la formación de grandes complejos heteromultiméricos (ver más adelante). Además, la oligomerización de SMN enmascara un degrón, secuencia reguladora de la degradación de la proteína y sustrato para su ubiquitinización (Cho & Dreyfuss, 2010; Gray *et al.*, 2018), lo que aumenta la estabilidad de la proteína.

2.2. Isoformas de SMN

Además del transcrito que da lugar a la proteína completa, *SMN1* y *SMN2* producen otros transcritos mediante cortes y empalmes alternativos. Se conocen al menos 7, siendo los principales exones afectados el 5 y el 7 (Jong *et al.*, 2000), desconociéndose aún sus potenciales funciones. Actualmente, solo las proteínas de tres de estos transcritos han sido identificadas: SMN Δ 7, a-SMN y SMN6B. A continuación, se describen sus características (Fig. 3).

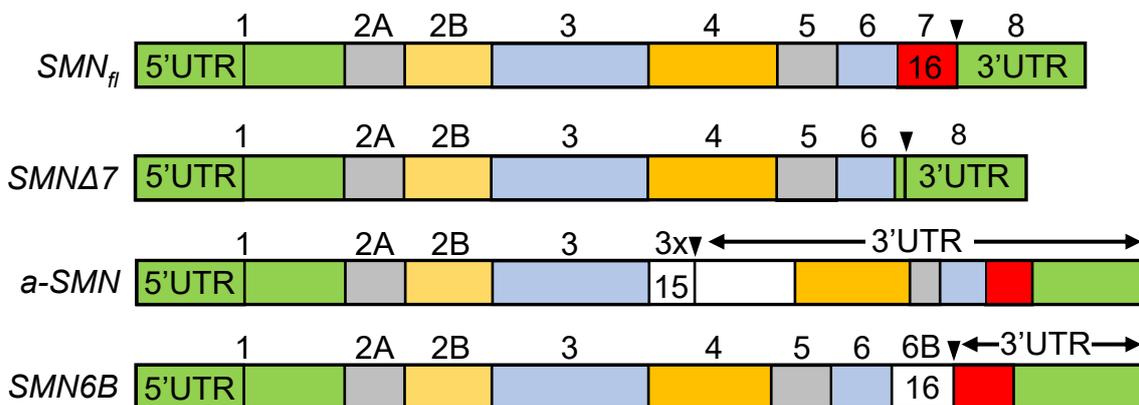


Figura 3. Representación esquemática de transcritos de *SMN1* y *SMN2*. El nombre de cada transcrito se indica a la izquierda y el número del exón se indica sobre el recuadro de color correspondiente. La localización de los codones de parada está señalizada con puntas de flecha. Los intrones exonizados vienen representados por cajetines blancos. El número de aminoácidos codificados por el exón del extremo C-terminal están representados en el interior del cajetín correspondiente. Nótese que en *SMNΔ*7 un segmento del exón 8 se sitúa previo al codón de parada, correspondiendo con la secuencia codificante para los aminoácidos EMLA. UTR: región no traducida. Modificada de Singh *et al.*, 2017.

La isoforma mejor conocida de SMN es SMN Δ 7. Esta isoforma es el producto principal del gen *SMN2* y presenta una secuencia idéntica a SMN_n en los primeros 278 aa. Sin embargo, la exclusión del exón 7 lleva a una pérdida de los últimos 16 aa. En su lugar, SMN Δ 7 incorpora 4 aa, EMLA, codificados por el exón 8, lo que resulta en una secuencia final de 282 aa. Esta modificación del extremo C-terminal afecta de forma importante a las propiedades de la proteína. La pérdida parcial del dominio YG resulta en una menor capacidad de oligomerización tanto con SMN_n como consigo misma (Lorson *et al.*, 1998). Ello impacta en la estabilidad de la proteína, puesto que el degrón localizado en exón 6 es enmascarado con la oligomerización y, además, la secuencia EMLA incrementa la actividad del mismo (Cho & Dreyfuss, 2010; Gray *et al.*, 2018)

Otra de las isoformas de SMN, a-SMN, resulta de la inclusión del intrón 3 en el transcrito. En la porción proximal del intrón 3 se localiza un codón de parada que induce la formación de una proteína de menor tamaño codificada por los exones 1-3, y parte del intrón 3 (Fig. 3). Esta isoforma únicamente se ha identificado en los axones, motivo por el cual se la nombró SMN axonal o a-SMN (Setola *et al.*, 2007; Locatelli *et al.*, 2012). *In vitro*, a-SMN parece estimular el crecimiento axonal y la motilidad celular, lo que sugiere que esta isoforma podría participar en el desarrollo del sistema nervioso. Sin embargo, aún no se ha confirmado esta función *in vivo* y se cree que tiene una repercusión limitada en la patogénesis de la AME puesto que mutaciones en el exón 6 producen la enfermedad a pesar de estar conservada la secuencia de a-SMN (Wirth, 2000; Sun *et al.*, 2005; Burghes & Beattie, 2009).

Por último, SMN6B es generada por la lectura e inclusión del intrón 6 (Fig. 3). De forma similar al intrón 3, la secuencia de este intrón presenta un codón de parada que provoca que la proteína resultante presente los exones 1-6 y parte del intrón 6 (Seo *et al.*, 2016; Yoshimoto *et al.*, 2016). Aunque se ha descrito una mayor estabilidad de esta isoforma que de SMN Δ 7, aún se desconoce con precisión su función fisiológica, así como su impacto en un contexto de deficiencia de SMN (Seo *et al.*, 2016).

2.3. Funciones y localizaciones de la proteína SMN

Como hemos explicado en el punto anterior, una característica fundamental de SMN es que es una proteína multidominio, lo que revela una propiedad esencial para comprender tanto el rol fisiológico como fisiopatológico de SMN: su multifuncionalidad (Espinosa-Cantú *et al.*, 2020), como se desprende de su complejo interactoma y su participación en múltiples procesos relacionados con el metabolismo del ARN.

Desde que se identificó la proteína en el núcleo en asociación con los Cuerpos de Cajal (CB) (Liu & Dreyfuss, 1996), se ha obtenido una gran cantidad de información en relación con la participación de SMN en múltiples procesos del metabolismo de ARN, donde parece ejercer un papel central (Singh *et al.*, 2017). Estos van desde la regulación de la transcripción hasta la regulación de la traducción, pasando por el ensamblaje de distintas ribonucleoproteínas, como las nucleares pequeñas (snRNP), las nucleolares pequeñas (snoRNP) y mensajeras (mRNP), la formación de gránulos de estrés o el tráfico de mRNP (Fig. 4). No obstante, SMN también parece estar participando en otros procesos ajenos al ARN, como en la reparación y recombinación del ADN, en la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), en la homeostasis de la ubiquitina o la autofagia (Takaku *et al.*, 2011; Garcera *et al.*, 2013; Wishart *et al.*, 2014; Genabai *et al.*, 2015), así como en ciertas funciones esenciales para las motoneuronas como el transporte de cargos, la regulación de la dinámica de la actina y la endocitosis (Nölle *et al.*, 2011; Peter *et al.*, 2011; Hensel & Claus, 2017). Algunas de estas funciones se explican con mayor detalle en los siguientes apartados en relación con su localización celular.

Además, en consonancia con su expresión ubicua en todas las células, SMN es una proteína pleiotrópica, es decir, su expresión influye en múltiples rasgos fenotípicos. Así, su deficiencia produce alteraciones en neuronas, la glía, el músculo esquelético y cardíaco, hígado, páncreas y bazo, entre otros (Braun *et al.*, 1995; Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2008; Martínez-Hernández *et al.*, 2009; Bevan *et al.*, 2010; Mentis *et al.*, 2011; Bowerman *et al.*, 2012; McGivern *et al.*, 2013; Khairallah *et al.*, 2017; Maxwell *et al.*, 2018; Deguise *et al.*, 2019; Berciano *et al.*, 2020). Por ello, actualmente se concibe la AME como una enfermedad multisistémica, aunque con afectación predominante de la motoneurona inferior (Yeo & Darras, 2020).

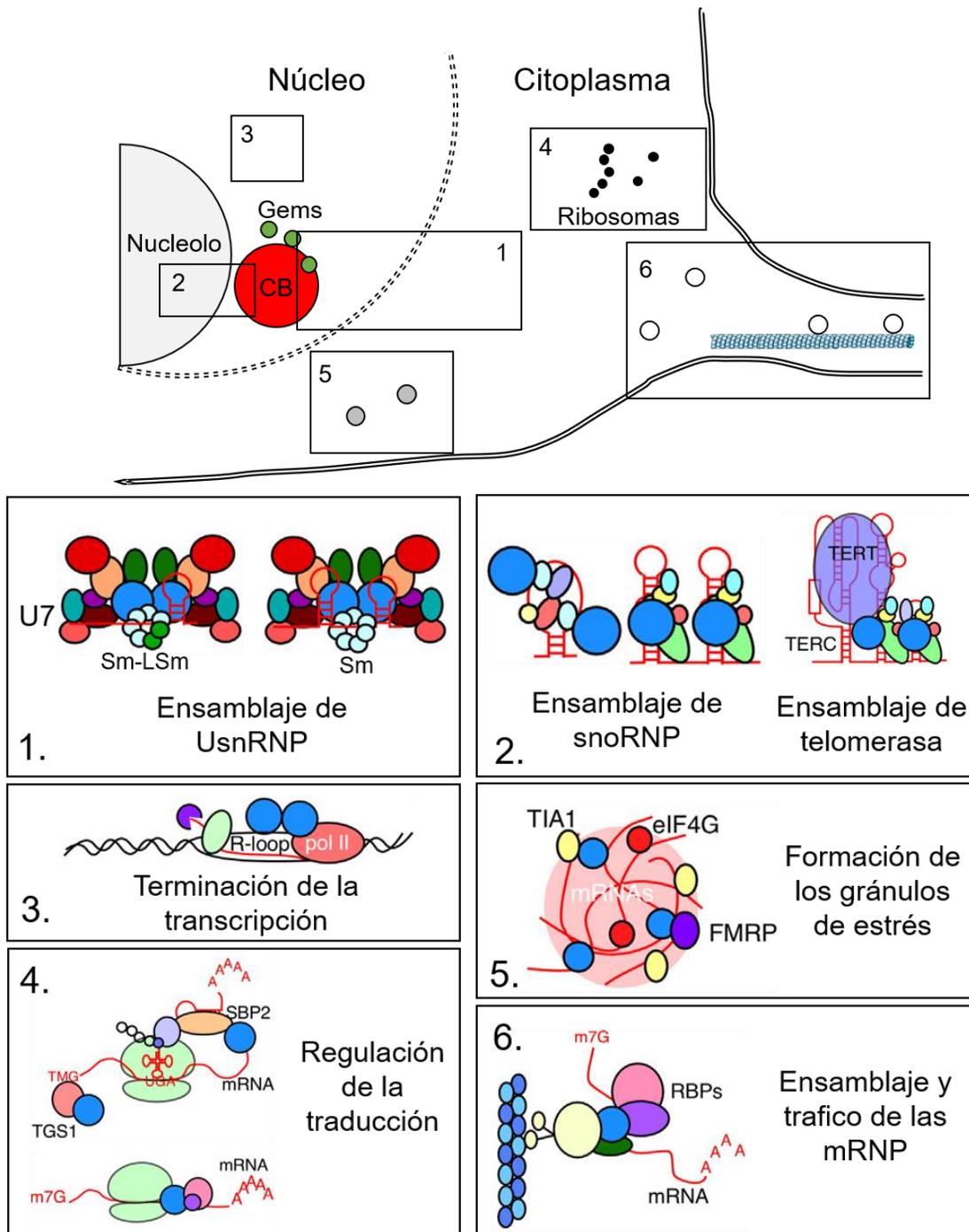


Figura 4. Funciones nucleares y citosólicas relacionadas con el metabolismo del ARN atribuidas a SMN. SMN (círculo azul) es una proteína multifuncional nuclear y citoplasmática que actúa en asociación con otras proteínas. Su función mejor conocida, realizada en conjunción con otras 8 proteínas en el denominado complejo SMN, es en el ensamblaje citosólico de las snRNP de clase Sm (panel derecho) y de la snRNP U7 (panel izquierdo) y su posterior importación nuclear (1). En el núcleo se postula que SMN participa junto con diskarina y WRAP53 en el ensamblaje de las snoRNP y las telomerasas, concretamente en el nucleolo y en los CB (2), y en la transcripción génica (3). En el citosol, SMN parece participar en el metabolismo del ARNm, concretamente en la regulación de la síntesis de proteínas y selenoproteínas (4), en la formación de gránulos de estrés (5), y en el ensamblaje y tráfico de las mRNP, de especial relevancia en las neuronas (6). Adaptada de Singh et al., 2017.

Se han propuesto varias hipótesis, potencialmente complementarias, para explicar el pleiotropismo de SMN: (i) debido a su multifuncionalidad, algunos de sus roles son específicos de tejido (Walker *et al.*, 2008; Khairallah *et al.*, 2017; Deguise *et al.*, 2019; Berciano *et al.*, 2020), (ii) por su rol en la biogénesis de las snRNP, afecta la maduración de ciertos subgrupos de ARNm específicos de cada tipo celular (Gabanella *et al.*, 2007; Pellizzoni, 2007) y (iii) por su participación en la regulación de ribosomal, modifica la traducción de ARNm específicos de tejido (Bernabò *et al.*, 2017; Lauria *et al.*, 2020).

Por último, para entender las distintas funciones de SMN en el contexto espaciotemporal es necesario tener en cuenta tanto su localización subcelular y tisular como su expresión temporal. En los siguientes apartados se tratarán estos aspectos.

2.3.1. Requerimiento espaciotemporal de SMN

Para entender las funciones de SMN y las consecuencias de su deficiencia en la AME es crítico conocer los requerimientos específicos que distintos tejidos tienen de la proteína desde las primeras etapas del desarrollo hasta la edad adulta. Como se ha mencionado anteriormente, SMN es una proteína ubicua y necesaria en la mayoría de células del organismo, sin embargo, investigaciones en un modelo murino de AME del grupo liderado por Arthur Burghes mostraron que el requerimiento de SMN del tejido nervioso es mayor que el de otros tejidos (Gavrulina *et al.*, 2008). Por ejemplo, mientras los niveles de SMN alcanzados con dos copias de *SMN2* son insuficientes para la supervivencia de las motoneuronas inferiores, la mayoría de tejidos sobreviven en ese contexto. Así mismo, Groen y colaboradores mostraron en dos modelos murinos que la expresión en el sistema nervioso central es mayor que en el resto de sistemas del organismo (Groen *et al.*, 2018). Sin embargo, aún se desconoce los mecanismos moleculares que median esta expresión diferencial en los distintos tejidos y por qué el sistema nervioso, en especial las motoneuronas, requieren una mayor expresión de SMN.

La expresión de SMN está, así mismo, regulada temporalmente (Jablonka & Sendtner, 2017; Ojala *et al.*, 2021). La Figura 5 muestra de forma esquemática la expresión y requerimientos murinos de SMN desde la fase embrionaria hasta la edad adulta en las motoneuronas inferiores. Los niveles de expresión de SMN son más altos durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano, pero disminuye bruscamente tras

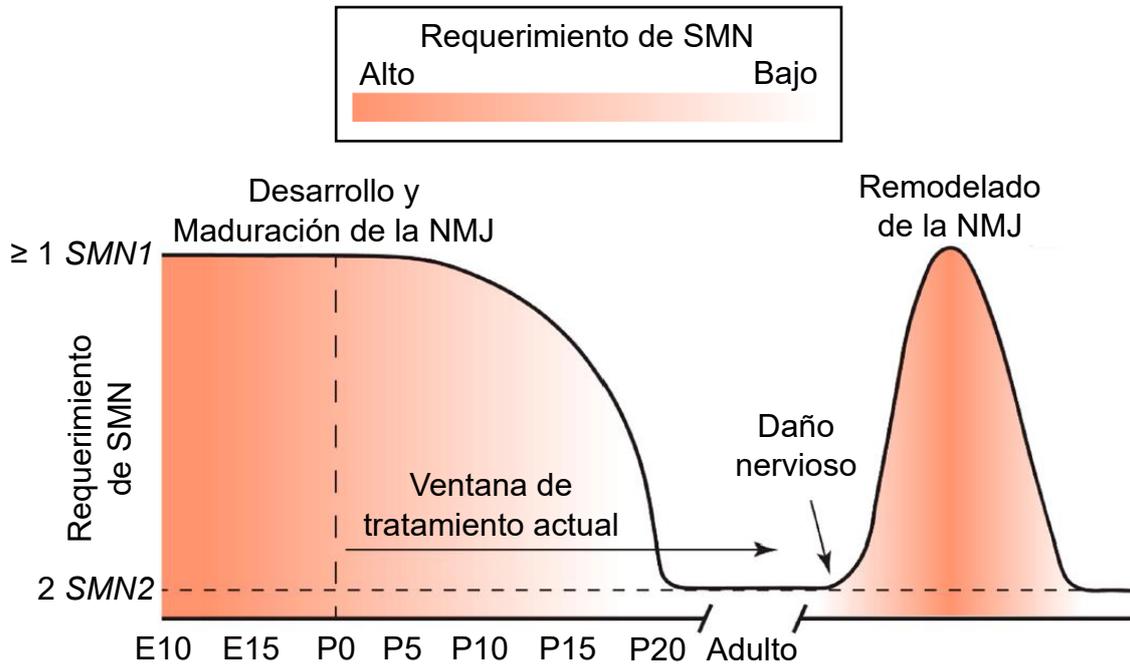


Figura 5. Requerimiento temporal de SMN en las motoneuronas inferiores murinas. Durante el desarrollo embrionario y coincidiendo con el desarrollo de la NMJ, la expresión y requerimientos de SMN en las motoneuronas alcanza su cenit para descender posteriormente (representado por el gradiente de naranja a blanco). Tras el periodo crítico de maduración postnatal de la NMJ (P0-P10), su expresión desciende bruscamente, siendo viables estas sinapsis a partir de entonces con niveles bajos de proteína, como los producidos por *SMN2* (línea discontinua). En la edad adulta, la remodelación y estabilización de la NMJ después de una lesión requiere niveles elevados de proteína. Por tanto, la ventana de tratamiento con fármacos que incrementen los niveles de SMN se restringe al periodo postnatal temprano. Adaptada de Kariya *et al.*, 2014 y Ojala *et al.*, 2021.

la primera semana de vida hasta alcanzar un nivel basal que se mantiene a lo largo de la vida (Gabanella *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010; Lutz *et al.*, 2011). Los niveles máximos de SMN en la médula espinal se producen durante la embriogénesis temprana y coinciden temporalmente con el crecimiento, búsqueda de dianas y mielinización de los axones de las motoneuronas (Burllet *et al.*, 1998; Jablonka *et al.*, 2000; Gabanella *et al.*, 2005). Tras la formación de la NMJ, prenatalmente, se produce un primer descenso de la expresión de SMN (Ling *et al.*, 2012). Posteriormente, entre los días postnatales (P) 5 y 15, se produce un segundo descenso, más acusado, que coincide con el periodo de maduración

y mantenimiento de la NMJ (Jablonka *et al.*, 2000). Finalmente, tras la maduración de la NMJ se mantienen niveles basales bajos de proteína que persisten durante la edad adulta.

Distintos estudios de expresión condicional de SMN han demostrado que el patrón temporal de expresión se adecua a los requerimientos de las motoneuronas. Por ejemplo, la inducción de la expresión de SMN durante el periodo embrionario o la fase sintomática temprana previene la patología neuromuscular y el desarrollo del fenotipo motor (Gavrilina *et al.*, 2008; Le *et al.*, 2011; Lutz *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2013). Tras la maduración de la NMJ (P17-20), las motoneuronas se vuelven insensibles a los niveles bajos de la proteína, como demuestra los escasos efectos que produce la depleción de SMN a partir de ese momento (Kariya *et al.*, 2014). En la edad adulta, únicamente vuelven a requerirse niveles altos de SMN en caso de daño nervioso y el subsiguiente remodelado de la NMJ (Fig. 5). Estos datos demuestran una mayor efectividad de la inducción temprana en la expresión de SMN en la recuperación del fenotipo, lo que tiene una importancia capital desde un punto de vista terapéutico (ver más adelante).

2.3.2. SMN en la biogénesis de las snRNP

SMN se asocia con sí misma y con otras proteínas formando distintos tipos de complejos heteromultiméricos cuya composición varía en los distintos compartimentos subcelulares. El complejo mejor caracterizado, tanto bioquímica como funcionalmente, es el denominado *complejo SMN* localizado tanto en el núcleo, concretamente en las estructuras denominadas *Gems*, como en el citoplasma de todas las células (Fischer *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2006; Burghes & Beattie, 2009; Lafarga *et al.*, 2017). Los *Gems*, o Gemelos de los Cuerpos de Cajal (del inglés *Gemini of Cajal's Bodies*), son unas estructuras nucleares íntimamente asociadas a los Cuerpos de Cajal (CB). Ambas estructuras están asociadas al nucleolo y contienen SMN (Lafarga *et al.*, 2017). Sin embargo, presentan importantes diferencias en su composición molecular que indican funciones distintas. Los CB contienen coilina y snRNP, motivo por el cual se le ha atribuido un rol en el metabolismo y maduración de los ARN y RNP nucleares. Los *Gems*, sin embargo, carecen de estos componentes. La función concreta de los *Gems* y su relación con los CB aún no se conoce con precisión.

En el citosol, el *complejo SMN* está formado por nueve proteínas distintas: SMN, Geminas 2-8 y UNRIP (Liu *et al.*, 1997; Charroux *et al.*, 1999, 2000; Baccon *et al.*, 2002; Gubitz *et al.*, 2002; Pellizzoni, Baccon, *et al.*, 2002; Carissimi *et al.*, 2005, 2006). Aunque la estequiometría y arquitectura exacta del *complejo SMN* es aún desconocida, existen modelos estructurales del complejo con base en las interacciones entre sus componentes (Fig. 6) (Otter *et al.*, 2007; Cauchi, 2010). SMN, Gemina 7 y Gemina 8 forman una plataforma sobre la que se incorporan el resto de las proteínas. SMN interactúa directamente con Gemina 2, Gemina 3 y Gemina 8, mientras que Gemina 4 y Gemina 5 interactúan con Gemina 3 y Gemina 2, respectivamente. Gemina 8 permite la incorporación del heterodímero Gemina 6-Gemina 7, el cual, a su vez, media la incorporación de otro componente del complejo conocido como UNRIP. Esta composición prototípica del *complejo SMN* se conserva en el citoplasma y en los *Gems* del núcleo, excepto que en el núcleo carece de Gemina 5 y UNRIP (Carissimi *et al.*, 2005; Hao *et al.*, 2007).

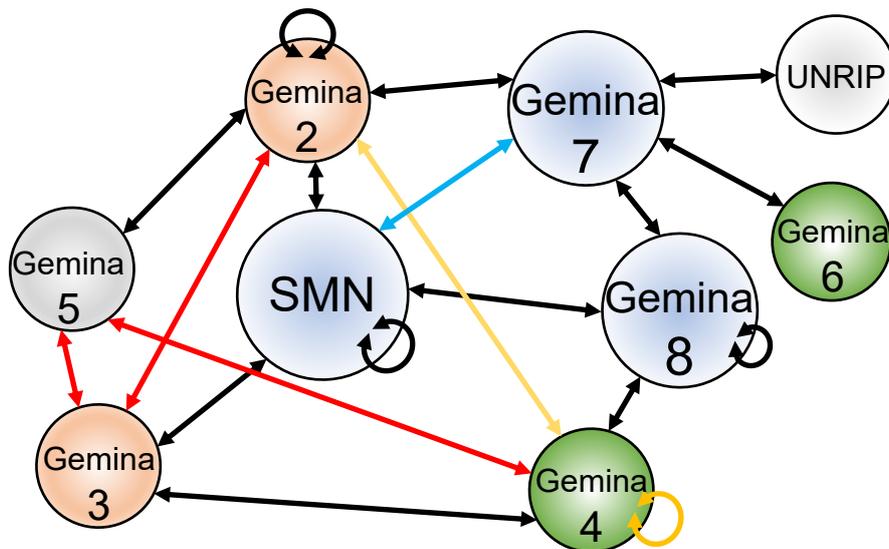


Figura 6. Mapa propuesto de interacciones proteicas en el *complejo SMN* humano. Las interacciones proteína-proteína identificadas mediante dos o más sistemas experimentales independientes están indicadas mediante flechas negras, mientras que las identificadas mediante un solo sistema experimental están identificadas mediante flechas de distintos colores, azules (experimento de captura mediante GST), rojas (co-impunoprecipitación) o amarillas (técnica de doble híbrido en levadura). Modificada de Cauchi, 2010.

Al ser SMN una proteína de pequeño tamaño, es poco probable que todas las interacciones con las geminas se produzcan en una misma molécula. Posiblemente la capacidad de SMN de oligomerizar permite la formación de complejos de orden superior (Pellizzoni *et al.*, 1999). Esta capacidad está alterada en pacientes con AME (Lorson *et al.*, 1998; Pellizzoni *et al.*, 1999), lo que implica que la oligomerización probablemente tenga un papel fundamental en la arquitectura del complejo SMN mediante la reunión de los diferentes componentes dentro de la misma entidad macromolecular.

La función mejor conocida del *complejo SMN* es en el ensamblaje de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP) de tipo Sm en el citosol de todas las células (Kolb *et al.*, 2007; Burghes & Beattie, 2009; Cauchi, 2010; Raimer *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017). Las snRNP se componen de un ARN pequeño nuclear rico en uridina (ARNpn U) y un anillo heteroheptamérico de proteínas de la familia LSM (del inglés *Sm-like*), a la que pertenecen las proteínas Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F y G) y una plétora de proteínas Lsm (homónimo de la familia proteica) (Fischer *et al.*, 2011). Actualmente, se conocen 10 tipos de snRNP tipo U: U1, U2, U4, U4atac, U5, U6, U6atac, U7, U11 y U12 (Matera *et al.*, 2007; Wahl *et al.*, 2009; Gruss *et al.*, 2017). Todos los ARNpn, menos U6, U6atac y U7, son sintetizados por la ARN polimerasa II y exportados al citosol, donde se asocian al anillo de proteínas Sm gracias a la acción del *complejo SMN* (Pellizzoni, 2007; Burghes & Beattie, 2009; Fischer *et al.*, 2011; Matera & Wang, 2014). Los ARNpn U6 y U6atac, en cambio, son sintetizadas por la ARN polimerasa III y se asocian en el núcleo a un anillo de proteínas Lsm (Matera *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2011). Finalmente, las ARNpn U7 se asocian a un anillo compuesto por proteínas Sm, salvo D1 y D2 que son sustituidas por las proteínas Lsm10 y 11 (Schümperli & Pillai, 2004).

Excepto U7, que participa en el procesamiento del extremo 3' del ARNm de histonas (Schümperli & Pillai, 2004), las snRNP son constituyentes esenciales del espliceosoma, macrocomplejos riboproteicos encargados de la maduración del ARNm mediante el proceso de corte y empalme (Wahl *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2011; Matera & Wang, 2014). Son fundamentales para el reconocimiento de los sitios de corte y empalme y actúan como soporte estructural para el resto de proteínas implicadas. Las snRNP U1, U2, U4, U5 y U6 forman parte del complejo mayor del espliceosoma, participando en el procesamiento de la mayoría de los intrones (intrones tipo U2). El resto

de intrones (intrones tipo U12) son procesados por el complejo menor del espliceosoma, constituido por U11, U12, U4atac, U5 y U6atac.

Aunque las proteínas Sm pueden asociarse a ARNpn *in vitro* (Raker *et al.*, 1999), *in vivo* se requiere del *complejo SMN* para su correcto ensamblaje (Pellizzoni, Yong, *et al.*, 2002). El *complejo SMN* actúa como chaperona en el proceso de incorporación de las proteínas Sm al ARNpn tipo U (Meister *et al.*, 2002; Burghes & Beattie, 2009; Raimer *et al.*, 2017) (Fig. 7). Inicialmente, el complejo PMRT5 o metilsoma, formado por la proteína reguladora de la conductancia del cloruro (pICln) y la proteína arginina-metiltransferasa 5 (PRMT5), recluta las proteínas Sm y metila junto con PRMT7 los dominios RG y RGG de SmB, D1 y D3 (Fig. 7, pasos 1-2) (Friesen, Paushkin, *et al.*, 2001; Meister *et al.*, 2001; Gonsalvez *et al.*, 2007; Chari *et al.*, 2008). A continuación, y en conjunción con el metilsoma, el *complejo SMN* completa la formación del anillo heptamérico de proteínas Sm y facilita su incorporación específica al ARNpn tipo U de forma ATP-dependiente (Fig. 7, pasos 3-6) (Pellizzoni, Yong, *et al.*, 2002). Dos elementos claves de este proceso son Gemina 5, fundamental para el reconocimiento de estas cadenas nucleotídicas (Yong *et al.*, 2010; Piñeiro *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2016; Wahl & Fischer, 2016), y el dominio Tudor de SMN, encargado de reconocer e interactuar con los dominios RG y RGG metilados (Friesen & Dreyfuss, 2000; Brahms *et al.*, 2001; Friesen, Massenet, *et al.*, 2001; Boisvert *et al.*, 2002).

A continuación, la recién formada snRNP sufre un primer proceso madurativo con la hipermetilación de su caperuza 5' por parte de la trimetilguanosa sintasa 1 (TGS1), la cual, junto con el propio anillo de Sm, sirve señal de importación nuclear (Fig. 7, paso 7) (Plessel *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 2011). Finalmente, el complejo junto con la snRNP es importado al núcleo gracias a la acción de SNPI y β -Importina (Fig. 7, paso 8) (Narayanan *et al.*, 2002, 2004). En el núcleo, el complejo SMN se disocia de las snRNP en los CB, en lo que probablemente por mediación de la coilina, y se dirige por mediación de ZPR1 a las gems (Fig. 7, paso 9). En los CB, las snRNP prosiguen su proceso de maduración y, finalmente, se incorporan al espliceosoma.

A pesar de la importante diferencia en la composición proteica del anillo heptamérico, el *complejo SMN* también participa de forma análoga en el ensamblaje de las snRNP U7 (Pillai *et al.*, 2003; Tisdale *et al.*, 2013). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo mediante el cual el complejo incorpora el anillo heptamérico híbrido

Sm/LSm. También se ha postulado una participación del complejo en la biogénesis de U6/U6atac snRNP, cuyo anillo proteico está compuesto por las proteínas LSm2-8 (Tharun, 2009), debido a las similitudes bioquímicas y estructurales entre los complejos de Sm y de LSm así como por la capacidad del complejo SMN de ensamblar anillos con ambas clases de proteínas, aunque aún se carece de evidencias experimentales directas al respecto (Li *et al.*, 2014).

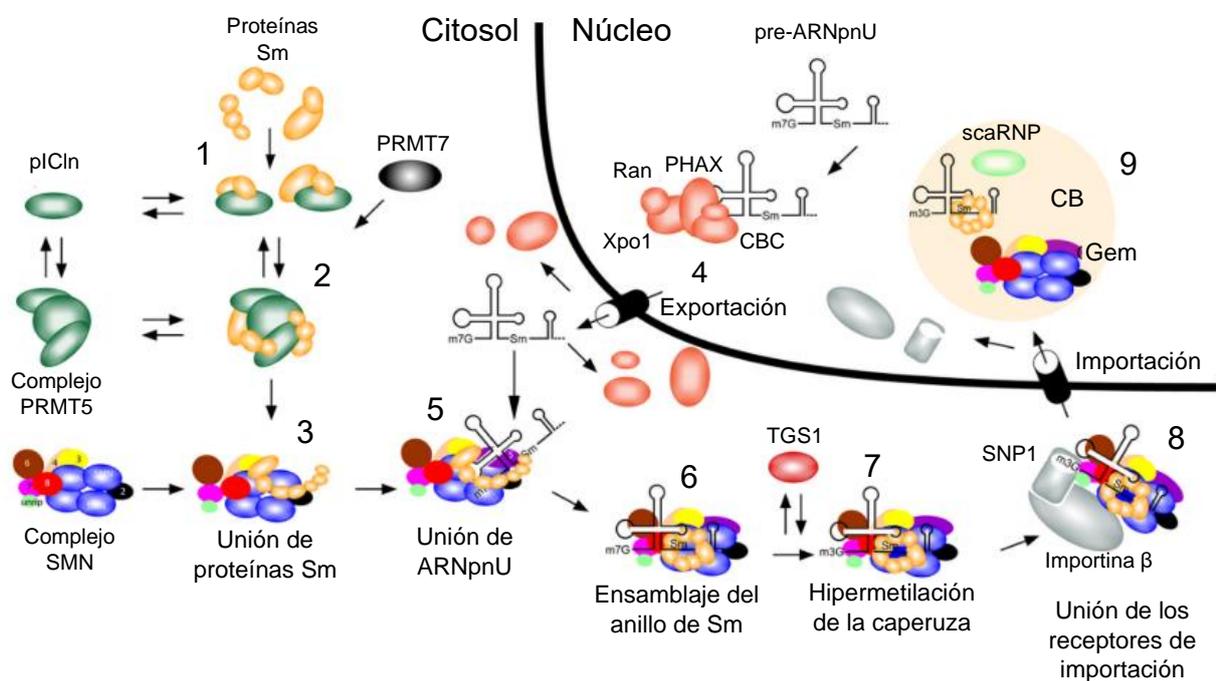


Figura 7. Papel del *complejo SMN* en la síntesis de las snRNP de tipo Sm.

Inicialmente, pICln forma complejos con las proteínas Sm (1). Estos forman, a su vez, un complejo de orden superior con la incorporación de PRMT5, formando el metilsoma o complejo PRMT5 e iniciando la estructuración del anillo heptamérico. Junto con PRMT7, el metilsoma metila los residuos de arginina de los dominios RG/RGG de las proteínas Sm y las hace reconocibles por el dominio Tudor de SMN (2). A través de esta interacción, el *complejo SMN* incorpora las proteínas Sm y libera el complejo PRMT5 (3). A continuación, el ARNpU sintetizado en el núcleo es exportado al citoplasma (4) y se incorpora al complejo SMN a través de su interacción con Gemina5 (5). Entonces, el *complejo SMN* ensambla al ARN las proteínas Sm, formando el característico anillo heptamérico y dando lugar a una snRNP inmadura (6). Posteriormente, TGS1 hipermetila la caperuza 5' de la recién formada snRNP (7), lo que permite el reconocimiento del complejo por parte de la snurportina y la importina β y su importación al núcleo (8). Finalmente, el complejo se disgrega en los CB (9), donde la snRNP termina de madurar, y los constituyentes del complejo SMN se desplazan a las Gems. Adaptada de Burghes & Beattie, 2009.

2.3.3. Otras funciones de SMN en el núcleo, nucleolo y citoplasma

Múltiples estudios han sugerido que la función de SMN en el núcleo no se limita a la importación de las snRNP, sino que tiene otras funciones específicas en este orgánulo. Por ejemplo, Zhao y colaboradores han mostrado que SMN participa en la transcripción a través de la interacción de su dominio Tudor con secuencias metiladas de la ARN polimerasa II, siendo necesaria esta interacción para la resolución de híbridos ADN-ARN (Pellizzoni, Charroux, *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2016). Sin embargo, se desconoce con exactitud si estas funciones las realiza cuando se asocia con algunas de las geminas (*complejo SMN*) o individualmente.

Así mismo, SMN está presente en el nucleolo e interacciona con proteínas como la diskarina, WRAP53, GAR1 y fibrilarina (Pellizzoni, Baccon, *et al.*, 2001; Mahmoudi *et al.*, 2010; Poole & Hebert, 2016), por lo que se ha asociado con la biogénesis de las ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNP), complejos encargados de la maduración de ciertos ARN no codificantes como ARNr o ARNpn. En particular, se le atribuye un rol en la biogénesis de un contingente de snoRNP específicas de los CB (scaRNP), fundamentales en el procesamiento de los ARNpn y de las telomerasas, complejos ribonucleoproteicos encargados de la replicación de los telómeros. Sin embargo, aún se desconoce si SMN actúa de forma directa en el metabolismo de estas RNP o de forma indirecta como soporte estructural o regulador espacial de las proteínas efectoras.

En el citosol, se postula también que SMN ejerce otras funciones independientes de las asignadas al *complejo SMN*. Por ejemplo, se le atribuye un papel en la formación de los gránulos de estrés (SG), centros de almacenamiento de ARNm y proteínas asociadas (Protter & Parker, 2016). Estudios en células HeLa y fibroblastos de pacientes AME han mostrado que SMN facilita la formación de los SG a través del dominio Tudor y el exón 7 (Hua & Zhou, 2004). Aunque se desconoce el mecanismo subyacente, el hecho de que SMN interaccione con FMRP en estas estructuras y que la integridad de su dominio K permita la formación de pequeños SG sugiere que la proteína puede estar reclutando tanto mRNP como directamente ARNm (Hua & Zhou, 2004; Piazzon *et al.*, 2008). No obstante, se ignora el impacto que la alteración en la homeostasis de los SG

puede tener en la AME. Así mismo, se le ha atribuido a SMN un rol en el ensamblaje de las mRNP, en la regulación de la traducción y en la homeostasis de la actina. Dado que estas funciones se llevan a cabo tanto en el soma como en las proyecciones celulares, tiene un enorme interés conocer el rol de SMN en los distintos compartimentos subcelulares y las alteraciones fisiopatológicas que su déficit produce en el cono de crecimiento, el axón y el terminal nervioso. A continuación, se tratan dichos aspectos.

2.3.4. SMN en la biogénesis y tráfico axonal de las mRNP

Como se ha mencionado anteriormente la distribución de SMN no se restringe al núcleo y citoplasma somático, sino que también se encuentra en las prolongaciones celulares. En cultivos de neuronas se ha descrito formando gránulos en neuritas, axones y conos de crecimiento (Fig. 8). En estas localizaciones, los gránulos con SMN presentan dos características llamativas que sugieren una funcionalidad distinta a la observada en el núcleo o el soma. Los gránulos axonales, por ejemplo, carecen de proteínas Sm, elemento indispensable para la biogénesis de las snRNP (Zhang *et al.*, 2006; Todd, *et al.*, 2010a; Fallini *et al.*, 2011). Además, estudios *in vivo* en embriones de pez cebra deficientes en Smn endógena han mostrado que algunas formas mutadas de la proteína SMN expresadas de forma heteróloga, mantienen la funcionalidad en la biogénesis de las snRNP pero no recuperan los defectos en el crecimiento axonal (Carrel *et al.*, 2006).

Por otro lado, estudios *in vitro* en células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y han mostrado en neuritas dos poblaciones de gránulos de SMN en función de su tamaño y movilidad. Una formada por gránulos gruesos, $> 0,5 \mu\text{m}$ de diámetro, que presenta una mecánica estática-oscilatoria y otra formada por gránulos finos, $< 0,5 \mu\text{m}$ de diámetro, que presentan signos de transporte activo bidireccional, con una velocidad de desplazamiento medio de $0,34\text{-}0,46 \mu\text{m/s}$ y con una velocidad máxima de hasta $1 \mu\text{m/s}$ (Todd, *et al.*, 2010b). En motoneuronas en cultivo se han descrito también dos poblaciones de gránulos axonales de SMN (Zhang *et al.*, 2006; Fallini *et al.*, 2010), los pequeños presentan una velocidad de desplazamiento medio de $1 \mu\text{m/s}$ y una velocidad máxima de hasta $2,5 \mu\text{m/s}$. Los gránulos grandes, sin embargo, presentan una velocidad máxima de menos de $0,5 \mu\text{m/s}$.

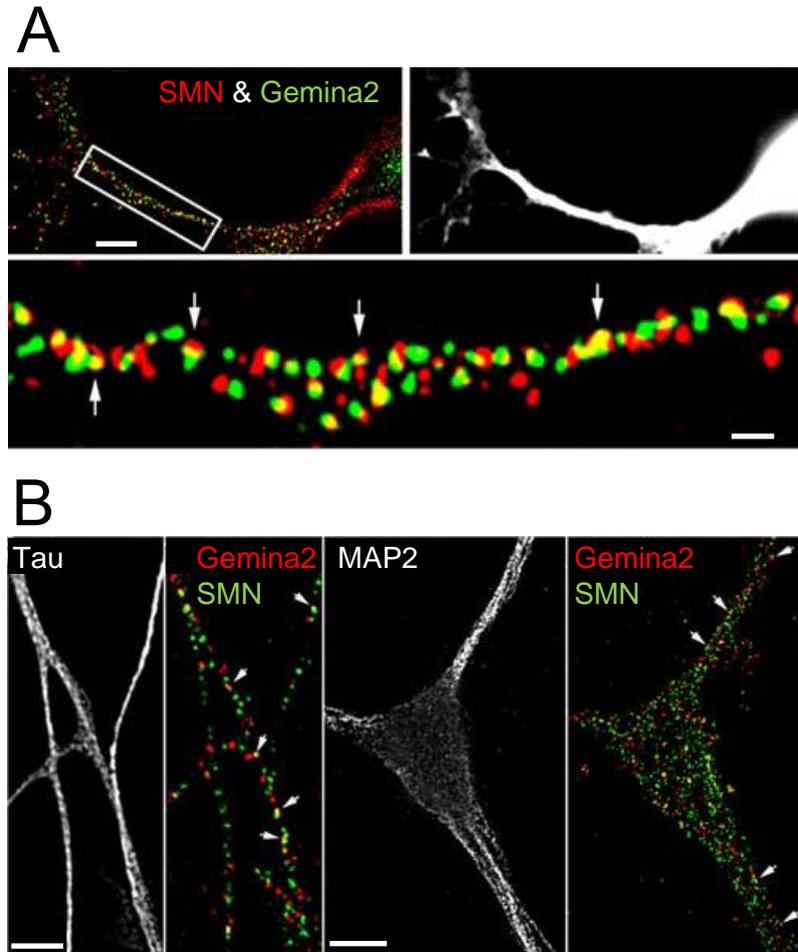


Figura 8. SMN presenta aspecto granular en distintos compartimentos de la motoneurona. Doble marcaje inmunofluorescente contra SMN (anticuerpo monoclonal de ratón) y Gemina 2 (anticuerpo policlonal de conejo) en cultivos de motoneuronas. **A.** Célula madre embrionaria diferenciada en motoneurona (DIV 3) que muestra la presencia de SMN (rojo) y Gemina 2 (verde) formando gránulos en las neuritas. Nótese la colocalización (flechas) de ambas proteínas cuando se aumenta la magnificación de la región delimitada (panel inferior). Esta célula expresaba EGFP (blanco) inducible por un promotor específico de motoneuronas. Barras de escalas: 5 μm y 1 μm (recuadro) **B.** Cultivo primario de motoneuronas embrionaria (DIV 7) en el que se muestra la expresión granular de SMN (verde) y Gemina 2 (rojo) en los axones, identificados mediante marcaje de tau (blanco, paneles izquierdos), y en las dendritas, identificadas mediante marcaje de MAP2 (blanco, paneles derechos). La colocalización entre ambas señales se indica mediante flechas. Barras de escala: 5 μm (panel izquierdo) y 10 μm (panel derecho). Modificada de Zhang et al., 2006

Pese a que la composición exacta de los gránulos de SMN aún se desconoce, se sospecha que son heterogéneos. En neuritas de células SH-SY5Y, por ejemplo, las geminas están presentes en el 60-86% de los gránulos (Todd, *et al.*, 2010a) y otras

proteínas, como UNRIP o ZPR1, en el 20-32% de los mismos. En axones de motoneuronas en cultivo existen gránulos de SMN que contienen Gemina 2 y 3 y UNRIP (Zhang *et al.*, 2006; Fallini *et al.*, 2011), otros que contienen Gemina 2 y Gemina 3, otros sin geminas y, finalmente, otros que contienen Gemina 2 pero que carecen de SMN (Zhang *et al.*, 2006; Todd, Morse, Shaw, McGinley, *et al.*, 2010). Aún se desconocen las implicaciones funcionales de estas subpoblaciones de gránulos, así como su potencial afectación en AME.

Aunque el rol biológico de estos gránulos aún no está claro, se postula que SMN está participando en el tráfico dendrítico y axonal de ARNm. Esta hipótesis se basa en varios hallazgos. Por un lado, la deficiencia en SMN altera la localización del ARNm poliadenilado en axones de motoneuronas en cultivo (Fallini *et al.*, 2016). Por otro, en los gránulos se han identificado proteínas de unión a ARNm (RBP, Fig. 9). Por ejemplo, se ha descrito que hnRNP R colocaliza con SMN tanto en los axones (Rossoll *et al.*, 2002) como en los terminales presinápticos motores (Dombert *et al.*, 2014) en preparaciones *ex vivo*. La proteína HuD, una RBP específica del tejido nervioso, colocaliza y es cotransportada con SMN en los axones de motoneuronas en cultivo (Fig. 9) (Akten *et al.*, 2011; Fallini *et al.*, 2011; Hubers *et al.*, 2011). Finalmente, IMP1, una RBP implicada en el transporte y estabilización del ARNm de β -actina, se asocia con SMN en axones y conos de crecimiento de motoneuronas en cultivo, siendo necesaria SMN para su correcta localización en estos compartimentos así como para su asociación con ARNm (Fallini *et al.*, 2014, 2016; Donlin-Asp *et al.*, 2017). Aunque se aún no está definido el mecanismo subyacente a la formación de los gránulos, se sugiere que SMN podría estar participando como chaperona en el ensamblaje de las RBP al ARNm para la formación de mRNP.

Es significativo que tanto las RBP como los ARNm cuyo tráfico está alterado en el contexto de niveles bajos de SMN parecen ser de especial importancia para el desarrollo y mantenimiento del axón y del terminal nervioso. Por ejemplo, las RBP previamente mencionadas presentan un alto nivel de expresión durante el neurodesarrollo y se les atribuye un rol en el crecimiento, arborización, búsqueda de dianas y regeneración axonal, de gran relevancia en las motoneuronas (Mobarak *et al.*, 2000; Glinka *et al.*, 2010; Akten *et al.*, 2011; Dombert *et al.*, 2014; Lepelletier *et al.*, 2017). Se postula que estas funciones las realizan a través de la estabilización del ARNm que codifican proteínas esenciales para estos procesos. HuD, por ejemplo, se asocia y estabiliza los ARNm de *GAP43* y *Cpg15* en neuronas *in vivo* y en motoneuronas en cultivo, respectivamente

(Mobarak *et al.*, 2000; Akten *et al.*, 2011; Yoo *et al.*, 2013). Estos transcritos están relacionados con fenómenos de crecimiento, arborización y regeneración axonal (Anderson *et al.*, 2003; Karamoysoyli *et al.*, 2008; Akten *et al.*, 2011). Cpg15, además, parece participaren tanto en la sinaptogénesis como en la estabilidad, plasticidad y maduración sináptica (Fujino *et al.*, 2003, 2011; Javaherian & Cline, 2005; Picard *et al.*, 2014). En larvas de *Xenopus*, por ejemplo, cpg15 promueve la formación y maduración *in vivo* de la NMJ, aunque se desconoce si también está implicada en este proceso en mamíferos (Javaherian & Cline, 2005). hnRNP R e IMP1, por otro lado, se asocian al ARN de β -actina (Glinka *et al.*, 2010) en los axones, principal isoforma de la actina en los axones y esencial para procesos tales como el crecimiento y arborización axonal, la búsqueda de dianas, la sinaptogénesis (Rathod *et al.*, 2012; Donnelly *et al.*, 2013; Moradi *et al.*, 2017), así como para la endocitosis y el ciclo vesicular en el terminal sináptico (Cingolani & Goda, 2008; Spence & Soderling, 2015; Yan *et al.*, 2016), procesos que están alterados en distintos modelos de AME (Torres-Benito *et al.*, 2012; Hosseinibarkooie *et al.*, 2016; Hensel & Claus, 2017; López-Manzaneda *et al.*, 2021).

Además de los transcritos mencionados, la deficiencia en SMN altera específicamente la localización axonal de mensajeros implicados en procesos esenciales para supervivencia y funcionalidad de la motoneurona y la sinapsis. En células NSC-34, SMN coinmunoprecipita con mensajeros enriquecidos en los axones (Rage *et al.*, 2013) y estudios transcriptómicos en motoneuronas deficientes en SMN en cultivos han mostrado una reducción mensajeros axonicos asociados a la regulación del citoesqueleto y a la actividad sináptica (Saal *et al.*, 2014). Así mismo también se han observado en motoneuronas procedentes de ratones AME alteraciones en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético mitocondrial, esencial para la actividad sináptica (Miller *et al.*, 2016).

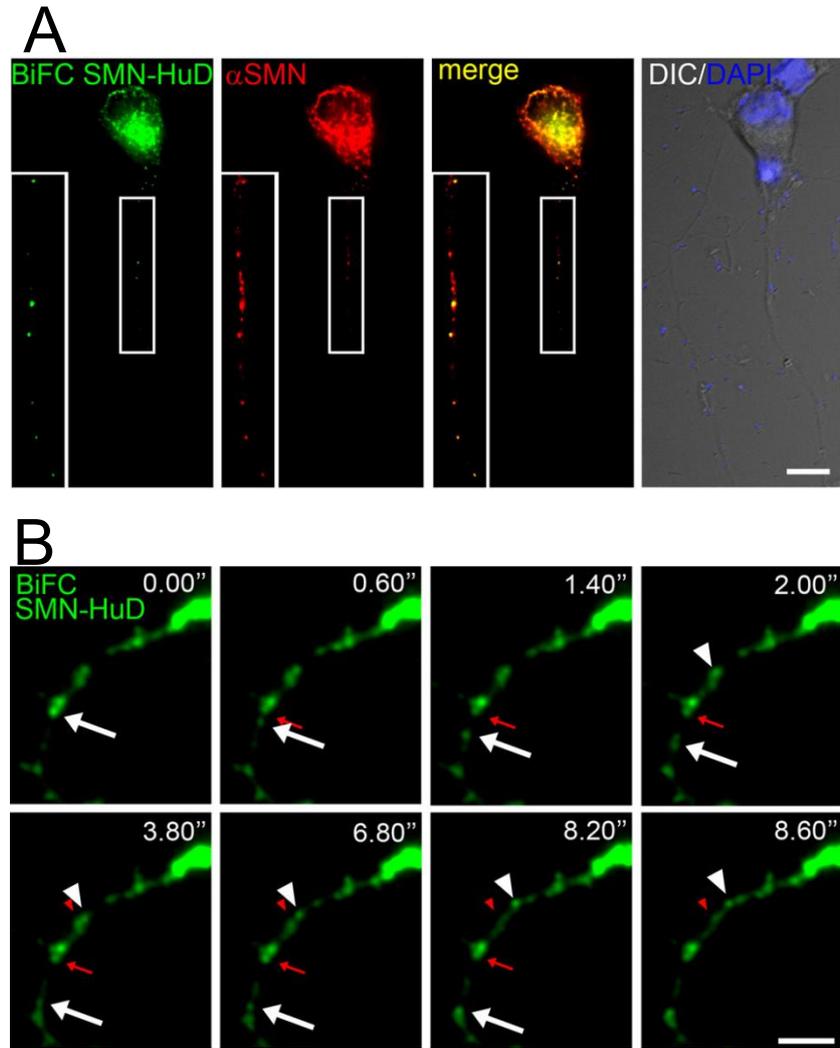


Figura 9. Los gránulos axonales de SMN contienen RBP. A. Cultivo primario de motoneuronas embrionarias transfectadas con constructos de SMN y HuD para complementación bifluorescente (BiFC, verde), que muestra la coexistencia de ambas proteínas en un mismo complejo, y marcados para SMN (rojo). Los gránulos así identificados están presentes en el soma y en el axón de la motoneurona. Barra de escala: 10 μm . **B.** Registro de imagen dinámica que muestra el movimiento bidireccional de los gránulos positivos para HuD y SMN en el axón. Se observaron trayectorias anterógradas (flechas) y retrógradas (puntas de flechas). Ambos gránulos se movieron a una velocidad media de 1 $\mu\text{m/s}$. Las flechas y puntas de flecha rojas indican la posición inicial de los gránulos analizados. Barra de escala: 5 μm . Modificada de Fallini *et al.*, 2011.

2.3.5. SMN y traducción del ARNm

Recientemente se ha postulado la participación de SMN en el proceso de traducción ya que SMN no solo se asocia mRNP, sino también a polisomas en cultivos de motoneuronas (Sanchez *et al.*, 2013). Bernabò y colaboradores confirmaron *in vivo* la asociación entre SMN y los polisomas en muestras de cerebro y medula espinal (Bernabò *et al.*, 2017). También determinaron una disminución de la fracción ribosomal que conforma los polisomas en ambos tejidos durante el periodo presintomático en un modelo murino de AME, lo que sugiere una alteración de la traducción desde etapas iniciales de la enfermedad. Estos defectos son celularmente autónomos, dependiente de los niveles de SMN y correlacionan con la historia natural de la enfermedad. Al igual que en el tráfico axonal, la deficiencia de SMN parece alterar la traducción de ciertos contingentes de ARNm, incluido algunos relacionados con la biología de los ribosomas. Aunque previamente se había descrito regulación negativa *in vitro* por parte SMN en la traducción de una proteína relacionada con la regulación del ARN, un reciente estudio *in vivo* sugiere que mayoritariamente SMN regula positivamente la traducción (Lauria *et al.*, 2020). Según el modelo propuesto por los Prof. Viero y Gillingwater, SMN se asocia y modula un pequeño contingente específico de ribosomas que se caracteriza por participar en la traducción de un subconjunto específico de ARNm y por asociarse con estos en los primeros 5 codones de la secuencia codificante. Esta asociación ribosoma-mensajero requiere de SMN y está afectada en la AME. Estos transcritos codificarían para proteínas implicadas en la fisiología axonal, sináptica, ribosomal, de los ácidos grasos y de la cromatina, procesos afectados característicamente en la AME y otras patologías neuromusculares como la ELA.

También se ha postulado una posible participación de SMN en la traducción de un contingente de proteínas relacionadas con la regulación del estado de estrés oxidativo celular, las selenoproteínas, a tenor de la asociación de SMN con el ARNm de una de ellas y de su interacción con las proteínas TGS1 y SBP2, esenciales en este proceso (Wurth *et al.*, 2014). En este sentido, se ha demostrado que SMN es necesaria para la traducción *in vivo* de GPx1 y que la homeostasis de las selenoproteínas está alterada específicamente en la medula espinal de ratones modelo de AME (Gribbling-Burrer *et al.*, 2017).

Finalmente, algunos estudios *in vitro* sugieren la participación de SMN en la regulación de la síntesis local, proceso esencial durante el desarrollo del sistema nervioso para el crecimiento axonal y la búsqueda de dianas (Giuditta *et al.*, 2008; Lin & Holt, 2008; Di Liegro *et al.*, 2014; Shigeoka *et al.*, 2016). En cultivos de motoneuronas, por ejemplo, la deficiencia de SMN induce una menor síntesis local de proteínas en el axón y en el cono de crecimiento (Fallini *et al.*, 2016). Aunque se desconoce el mecanismo subyacente, se ha postulado que pueda estar mediado por la vía del ARN interferente, ya que distintos micro ARN (miARN) que participan en la síntesis local, como miR-183 o miR-431, se han encontrado desregulados en estos estudios *in vitro* (Kye *et al.*, 2014; Wertz *et al.*, 2016). Complementariamente, como hemos mencionado previamente, también pudiera estar mediado este efecto por una disminución de la regulación de actividad ribosomal por la deficiencia en SMN (Lauria *et al.*, 2020). En este sentido, se ha observado que SMN media el anclaje de los ribosomas a la membrana plasmática de fibroblastos en cultivo, siendo esta asociación necesaria para el remodelado de la actina submembranal (Gabanella *et al.*, 2016).

Sin embargo, poco se sabe acerca de la síntesis local *in vivo* en las motoneuronas durante la maduración postnatal y la edad adulta más allá de su implicación en la regeneración axonal (Jung *et al.*, 2012; Tasdemir-Yilmaz & Segal, 2016), por lo que es de interés conocer el rol de SMN en la traducción local *in vivo* en axones y terminales motores. Postnatalmente, los axones motores presentan unas estructuras íntimamente asociadas a la membrana plasmática que contienen elementos de la maquinaria de síntesis proteica tales como ribosomas, ARNm y RBP (Koenig & Martin, 1996; Koenig *et al.*, 2000; Kun *et al.*, 2007; Sotelo-Silveira *et al.*, 2008). En un modelo de ratón de AME, se ha descrito una disminución de ribosomas axonales (Lauria *et al.*, 2020), sin embargo, aún se desconoce si esta maquinaria está activa durante la maduración del circuito motor o simplemente cumple una función reactiva en casos de daño axonal. Del papel de la síntesis local en la NMJ se conoce menos aún, de hecho, hasta la fecha no se ha descrito la presencia de RBP, ARNm o ribosomas en el terminal presináptico motor durante la maduración postnatal.

3. Impacto de la deficiencia de SMN en el sistema motor

Como se ha mencionado previamente, los hallazgos patológicos fundamentales en la AME pueden resumirse en: *i)* alteración del gen *SMN1* y la subsiguiente reducción de los niveles de proteína SMN, *ii)* alteración histológica de la medula espinal con pérdida de motoneuronas, y *iii)* alteración funcional del sistema motor, con debilidad y atrofia muscular simétrica predominante en la musculatura proximal y axial.

En los puntos anteriores hemos tratado los tipos clínicos de AME, la genética de la enfermedad y las complejas funciones de SMN. A continuación, se resumen los hallazgos fisiopatológicos que la deficiencia de SMN genera en el circuito motor.

3.1. Patología de la motoneurona en la AME

Actualmente la AME está considerada una enfermedad multisistémica ya que no solo afecta a las motoneuronas sino también al metabolismo y a ciertos órganos y sistemas como el vascular, hígado, músculo esquelético, corazón y páncreas (Yeo & Darras, 2020). Las motoneuronas intrafusales son susceptibles al déficit de SMN pero no las γ -motoneuronas y otras neuronas colinérgicas espinales (Powis & Gillingwater, 2016). Así mismo, las α -motoneuronas presentan una gran heterogeneidad en su susceptibilidad a los niveles bajos de SMN, pudiéndose encontrar incluso contingentes totalmente respetados durante el transcurso de la enfermedad como las que inervan los músculos extraoculares. Dentro de las motoneuronas vulnerables, las que inervan a los músculos axiales y proximales, en general, se afectan antes que las que inervan a los músculos distales y el diafragma. Esto tiene un reflejo topográfico en la médula, mostrando una vulnerabilidad diferencial en función del segmento medular. Por ejemplo, los contingentes de motoneuronas localizados en L1 y en la columna motora medial, encargados de inervar a los músculos proximales y axiales, están más afectados que los localizados en L5 y en la columna motora lateral, encargados de los músculos distales (Mentis *et al.*, 2011).

Aunque, el mecanismo subyacente a esta heterogeneidad aún no se conoce con exactitud, se han postulado varias hipótesis al respecto. Por un lado, puesto que las células

del asta dorsal espinal, respetadas, presentan mayores niveles de inclusión del exón 7 en los transcritos de *SMN2* que la motoneuronas del asta ventral, es posible que entre los distintos contingentes de motoneuronas también varíe la eficiencia de este proceso y presente niveles variables de proteína completa (Ruggiu *et al.*, 2012). No obstante, aún no se ha confirmado una inclusión diferencial entre distintos contingentes de motoneuronas ni su correlación con la patología. Por otro lado, es posible que exista una heterogeneidad en los niveles de ciertos ARNm y/o proteínas entre los distintos contingentes de motoneuronas y que, teniendo en cuenta la función de SMN en el metabolismo del ARN, puedan determinar la distinta vulnerabilidad. Experimentos realizados en nuestro laboratorio (Tejero, 2016; Tejero *et al.*, 2016) han demostrado que durante el desarrollo postnatal de la NMJ existe una transición entre dos de las isoformas de sinaptotagmina (Syt) que actúan como sensor de calcio para la exocitosis en el terminal presináptico motor. Durante el periodo postnatal de maduración de la NMJ Syt-1 se regula a la baja y Syt-2 al alza, siendo esta última la isoforma relevante tras este periodo. Fisiológicamente la velocidad de este cambio varía temporalmente entre distintos músculos. Dado que los terminales motores en AME los niveles de Syt-2 están significativamente disminuidos en relación con los terminales controles (Tejero, 2016; Tejero *et al.*, 2016), en los músculos donde Syt-1 desaparece más rápidamente se produce un gran déficit de ambos sensores de calcio que correlaciona con el déficit en la neurotransmisión en los músculos vulnerables.

Por otro lado, no se conocen con exactitud los mecanismos subyacentes a la degeneración y muerte de las α -motoneuronas, aunque distintas líneas de investigación sugieren que es secundaria a fenómenos apoptóticos. Por un lado, un estudio de silenciamiento selectivo del gen *Smn* en las motoneuronas de *C. elegans* ha demostrado que la reducción en proteína *Smn* provoca la muerte de las mismas *in vivo* por fenómenos apoptóticos (Gallotta *et al.*, 2016). En este sentido, SMN parece tener un efecto modulador en la apoptosis. Por ejemplo, la sobreexpresión de SMN *in vivo* en un modelo proapoptótico murino reduce los fenómenos de apoptosis en las neuronas del córtex (Kerr *et al.*, 2000). En una serie de estudios recientes, Mentis y colaboradores demostraron que la muerte y degeneración motoneuronal en el modelo SMN Δ 7 es secundaria a una mayor activación del factor proapoptótico p53 debida a su fosforilación. De hecho, se observa una correlación directa entre el grado de fosforilación de p53 y el grado de vulnerabilidad de la motoneurona (Simon *et al.*, 2017). Aunque el mecanismo molecular de la

sobreactivación de p53 aún no se conoce con precisión, un estudio posterior mostró que era secundaria a una desregulación de la maduración de los ARNm de Mdm2 y Mdm4, sus principales proteínas reguladoras, debido a la menor formación de snRNP provocada por los niveles reducidos de SMN (Van Alstyne *et al.*, 2018). De estos datos se deriva que la heterogeneidad en la supervivencia de las motoneuronas puede ser debida a defectos en el corte y empalme de ARNm fundamentales para ciertos contingentes.

Por otro lado, distintos grupos han postulado que la muerte de las motoneuronas se produce por autofagia. En motoneuronas en cultivo, por ejemplo, existe un incremento de los factores autofágicos Beclina 2, LC3-II y p63, así como de la ubiquitinación de proteínas, y un menor aclaramiento de los autofagosomas (Garcera *et al.*, 2013; Periyakaruppiyah *et al.*, 2016; Rodriguez-Muela *et al.*, 2018). La inhibición farmacológica de la autofagia incrementa la supervivencia de las motoneuronas y la esperanza de vida en modelos de ratón (Periyakaruppiyah *et al.*, 2016; Piras *et al.*, 2017; Rodriguez-Muela *et al.*, 2018).

3.2. ¿Es la AME una enfermedad de la motoneurona inferior o una enfermedad del sistema motor?

Aunque no se conoce con exactitud el impacto funcional que la muerte de las motoneuronas en la AME produce en el sistema motor, diversas evidencias señalan que la muerte de las motoneuronas no explica totalmente el fenotipo motor en la AME. Por ejemplo, aunque la restauración selectiva de SMN en las motoneuronas revierte tanto la muerte de éstas como los defectos sinápticos típicos de la enfermedad (ver más adelante), la función motora se recupera sólo moderadamente (Gogliotti *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2012; McGovern *et al.*, 2015; Fletcher *et al.*, 2017). Además, estudios en modelos de ratón han mostrado que la restauración selectiva y simultanea de la expresión de SMN en las células gliales, motoneuronas y otras neuronas induce una mayor recuperación del fenotipo motor y supervivencia que cuando se restaura exclusivamente en las motoneuronas (Gavrilina *et al.*, 2008; McGovern *et al.*, 2015). Así mismo, la expresión selectiva de SMN en los mocitos solo mejora ligeramente la función motora y la supervivencia *in vivo* (Gogliotti *et al.*, 2012).

En conjunto, estos y otros estudios demuestran que el déficit de SMN en células del sistema motor distintas a las neuronas motoras, como astrocitos (Rindt *et al.*, 2015), células de Schwann (Hunter *et al.*, 2014), neuronas sensoriales (Jablonka *et al.*, 2006; Mentis *et al.*, 2011) y miocitos (Gogliotti *et al.*, 2012), influye en la severidad de la enfermedad, lo que hace necesario una mayor comprensión del estado de estos circuitos en la AME

3.3. Patología de la NMJ

La pérdida de motoneuronas en la AME viene precedida por alteraciones en la neurotransmisión (Kong *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010). Los mecanismos que median la patología sináptica aún no se conocen en su totalidad. En los modelos de AME en ratones, la capacidad de las motoneuronas para inervar sus músculos diana no está alterada (Murray *et al.*, 2008) y los terminales nerviosos son funcionales durante el desarrollo postnatal temprano (Ruiz *et al.*, 2010), lo que sugiere que el fenotipo motor no es secundario a defectos en la sinaptogénesis, sino en la maduración y mantenimiento de la sinapsis. Conforme la maduración postnatal progresa, las NMJ deficientes en SMN desarrollan diversos defectos tanto estructurales y como funcionales. Sin embargo, de forma similar a lo que se produce en la médula, el grado de afectación de la sinapsis es heterogéneo, observándose en ciertos músculos una mayor vulnerabilidad, como en el transversal abdominal (TVA), que en otros, como el diafragma (Kariya *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2012; Tejero, 2016; Tejero *et al.*, 2016). A continuación se describirán las alteraciones más importantes de las NMJ descritas en la AME.

En los ratones deficientes en SMN del modelo SMN Δ 7, el citoesqueleto presináptico presenta signos de retraso madurativo, como la ausencia de reorganización y ramificación de los microtúbulos (MT) y una menor arborización y persistencia de estructuras en lazo de los neurofilamentos (NF) en sus segmentos finales (Torres-Benito *et al.*, 2011; Torres-Benito, 2012). Los microfilamentos también están afectados, con una disminución de la F-actina (Ackermann *et al.*, 2013). Así mismo, se observa defectos madurativos en la placa terminal, como son una disminución del área, número de perforaciones y desarrollo de los pliegues postsinápticos, así como retraso en la transición de la subunidad embrionaria γ -AChR a la madura ϵ -AChR (Kariya *et al.*, 2008). Aún se

desconocen los mecanismos que median este retraso madurativo y así como la posible función de SMN en este proceso. En estadios tardíos, se observan también acúmulos anómalos de NF, que alteran la morfología del terminal (Cifuentes-Diaz *et al.*, 2002), y denervación de numerosas fibras musculares (Ling *et al.*, 2012). No obstante, aún es objeto de debate si estas alteraciones degenerativas son producto primario de la deficiencia de SMN o una consecuencia del estado patológico del terminal. Tampoco está claro si estas alteraciones contribuyen a los defectos en la neurotransmisión observados en los modelos animales.

De los estudios electrofisiológicos realizados en preparaciones neuromusculares de modelos de ratón se extrae una conclusión clara, la deficiencia de SMN altera de forma importante la neurotransmisión en la NMJ. En estos modelos se ha demostrado que la amplitud y cinética de las respuestas postsináptica esta alterada (Kong *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010). En el modelo SMN Δ 7, por ejemplo, existe una disminución del contenido cuántico (QC; número de cuantos liberados por el terminal presináptico tras la llegada de un potencial de acción) (Kong *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010; Tejero *et al.*, 2016). Sin embargo, el origen de la disfunción sináptica aún no se conoce con precisión. La reducción del QC puede ser secundaria a una menor liberación de neurotransmisor por vesícula (tamaño cuántico), una menor probabilidad de liberación (*pr*) o un menor número de sitios activos de liberación (*n*). El estudio de las corrientes de placa en miniatura ha mostrado valores similares en los terminales motores controles y deficientes en SMN, lo que demuestra que el tamaño cuántico no está alterado en la AME (Kong *et al.*, 2009). Por otro lado, aunque se han descrito disminuciones en la probabilidad de liberación en diferentes modelos AME (Kong *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2012), en nuestro laboratorio hemos constatado que, a concentraciones fisiológicas de calcio extracelular, la reducción de QC es secundaria a un menor número de sitios de liberación activos (Tejero, 2016). En este sentido, se ha descrito mediante microscopía electrónica un menor número de vesículas ancladas a la membrana en la membrana plasmática (Cifuentes-Diaz *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2009). También se ha descrito un menor número de vesículas sinápticas y zonas activas, así como una desorganización de estas, en los terminales motores AME (Torres-Benito *et al.*, 2011, 2012; Torres-Benito, 2012).

El mecanismo que media la disminución del número de sitios activos y el déficit funcional del terminal motor es todavía desconocido, aunque distintas evidencias sugieren que alteraciones tanto el estado de la maquinaria exocítica como el de la

homeostasis del calcio en el terminal pueden estar participando en este proceso. Para fundirse de forma sincrónica, las vesículas sinápticas deben sufrir un proceso de cebado y anclaje a las zonas activas del terminal. En modelos murinos y de pez cebra se ha descrito una disminución de proteínas SV2 en los terminales motores mutantes, especialmente de la isoforma SV2B, a las que se les ha atribuido una participación en la regulación del cebado de las vesículas (Tejero, 2016; Tejero *et al.*, 2016, 2018). Además, existe una correlación entre el contenido en SV2B de la NMJ y la vulnerabilidad de los terminales de distintos músculos en la enfermedad. Otras de las funciones atribuidas a SV2 es la regulación de la endocitosis de Syt1 y Syt2 y en la regulación de la concentración de Ca^{2+} citosólico en el terminal. En esta línea, distintas evidencias han sugerido la coexistencia de una alteración de la homeostasis del calcio en este compartimento.

4. Perspectiva terapéutica

Hasta hace muy poco, la AME ha sido una enfermedad crónica, incurable, de pronóstico fatal y cuyo único tratamiento ha sido el de proporcionar soporte vital y cuidados paliativos. Sin embargo, la generación de modelos animales de la enfermedad ha permitido profundizar en el conocimiento etiológico y fisiopatológico de la enfermedad que, unido a los avances en las técnicas de biología molecular y terapia génica, ha dado lugar a nuevas estrategias terapéuticas que en algunos casos ya han conseguido resultados excelentes. Las estrategias actuales se sustentan en cuatro objetivos básicos:

1. Prevención de la enfermedad mediante la identificación de portadores y el diagnóstico genético preimplantacional (Fu *et al.*, 2019).
2. Aumento los niveles de SMN bien a través del reemplazo de *SMN1* mediante terapia génica o a través de la corrección farmacológica del procesamiento de *SMN2*.
3. Reemplazo de las neuronas motoras degeneradas y apoyo a las restantes mediante la implantación de células madre neurales.(Corti *et al.*, 2008, 2012)
4. Empleo de terapias complementarias farmacológicas que favorezcan la protección muscular y neurológica o potencien la funcionalidad del sistema motor.

4.1. Incremento de los niveles de SMN

Una de las estrategias más prometedoras y eficaces a la hora de tratar la AME es el incremento de los niveles de SMN. Actualmente, tres terapias inductoras de una mayor producción de SMN han sido aprobadas para su uso clínico por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) estadounidense (Tabla I): Spiranza[®], Evrysdi[™] y Zolgensma[®]. De estas, únicamente Spiranza ha sido aprobada por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para su uso clínico.

Estas terapias siguen dos estrategias distintas para conseguir elevar los niveles de SMN: la corrección del procesamiento de *SMN2* mediante moléculas pequeñas o el reemplazo de *SMN1* mediante terapia génica.

Tabla I. Resumen del estado de los ensayos clínicos que se están llevando a cabo en AME. Adaptada de www.cureSMA.org

ORGANIZACIÓN / Droga o estrategia	Desarrollo Preclínico			Ensayos Clínicos			Aprobación de la FDA
	Identificación	Optimización	Manufactura	Fase 1	Fase 2	Fase 3	
BIOGEN-IONIS / Spiranza	↓			↓			↓
NOVARTIS / Zolgensma (iv)	↓			↓			↓
ROCHE / Evisdy	↓			↓			↓
CITOKINETICS / CK-2127107	↓			↓			↓
NOVARTIS / LMI070	↓			↓			↓
SCHOLAR ROCK / SRK-015	↓			↓			↓
NOVARTIS / AVXS-101 (it)	↓			↓			↓
BIOGEN / BIB110	↓			↓			↓
COLUMBIA-NU / Inhibidor p38aMAPK	↓			↓			↓
MU-SHIFT PHARMACEUTICAL / E1 ASO	↓			↓			↓
BIOGEN / ASO 2ª generación	↓			↓			↓
AURIMMED PHARMA / SM	↓			↓			↓
CALIBR / SM	↓			↓			↓
IU-BRIGHAM & WOMEN'S / SM	↓			↓			↓
PRAXIS BIOTECH / Potenciador de síntesis proteica	↓			↓			↓
MONANI / Programa modificador	↓			↓			↓
HARVARD / SM	↓			↓			↓
PROYECTO INCARN	↓			↓			↓
PATTEN / Cribado en pez cebra	↓			↓			↓
JABLONKA / Modificador del VGCC	↓			↓			↓
MERINEY / Modificador del VGCC	↓			↓			↓

FDA: Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos; iv: intravenoso; it: intratecal; ASO: oligonucleótico antisentido; SM: molécula pequeña; ARNInc: ARN largo no codificante; VGCC: canal de calcio voltaje dependiente.

Zolgensma[®] (Onasemnogen abeparvovec-xioi o AVXS-101) es un vector viral adenoasociado complementario de serotipo 9 (scAAV-9) que porta ADN circular codificante de la proteína SMN_{II} humana. Tras una única aplicación intravenosa, el virus atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) y alcanza el SNC, donde es endocitado por las células. En el núcleo celular, la cápside es disgregada y se induce la expresión del ADN exógeno (McCarty *et al.*, 2001). Su aplicación a edades tempranas (P1) en el modelo murino SMN Δ 7 aumenta los niveles de SMN en el SNC y músculo, mejora la función motora y las alteraciones de la NMJ e incrementa espectacularmente la supervivencia (~250 días), siendo mucho menos efectiva al aplicarse tras la aparición de los síntomas (P10) (Foust *et al.*, 2010). Este fenómeno también ha sido descrito en un modelo porcino de AME (Duque *et al.*, 2015). En los ensayos clínicos, los pacientes tratados presintómicamente adquieren las capacidades motoras a edades similares que la población general. Aunque su aplicación postsintomática no es tan efectiva, bloquea la progresión de la enfermedad y mejora drásticamente la función respiratoria de los pacientes (Lowe *et al.*, 2019). No obstante, el uso de Zolgensma[®] presenta ciertos inconvenientes como el riesgo de aparición de trombocitopenia o fallo hepático grave, ineficacia por presencia de anticuerpos maternos anti-AAV y un elevado coste (2,1 millones de dólares, a enero de 2021) (Boutin *et al.*, 2010; Dyer, 2020).

Tanto Spiranza[®] como Evrisdi[™] incrementan los niveles de SMN al favorecer la inclusión del exón 7 en el ARNm maduro de SMN2. Sin embargo, el mecanismo de acción de ambas drogas es distinto. Spiranza[®] (Nusinersen) es un oligonucleótido antisentido (ASO) que es capaz de reconocer e inhibir el silenciador del corte y empalme intrónico N1 (ISS-N1), principal elemento inhibidor del corte y empalme del exón 7, favoreciendo la inclusión del mismo (Singh *et al.*, 2015, 2017). En los ensayos clínicos ha demostrado tener una elevada seguridad y eficacia, incrementando las capacidades motoras de la mayoría de pacientes. En los pacientes AME tipo I tratados con Nusinersen se observa un incremento excepcional de la esperanza de vida y de la función motora, alcanzando los principales hitos motores a unas edades similares a la población general (Finkel *et al.*, 2017; Mercuri *et al.*, 2018). Sin embargo, la evolución temporal y pronóstico de estos pacientes son aún desconocidos. En este sentido, al ser su aplicación intratecal y, por tanto, limitada al SNC, se desconoce el impacto a largo plazo que la deficiencia en SMN puede tener en otros sistemas también afectados. Su aplicación en pacientes con formas clínicas de aparición más tardías (tipo II en adelante) es menos efectiva, aunque también

induce una mejora en la calidad de vida con estabilización de la función motora y una reducción de la severidad de los síntomas (Zuluaga Sanchez *et al.*, 2019; Hagenacker *et al.*, 2020). Sin embargo, el fármaco no está exento de inconvenientes. Debido su escasa permeabilidad a través de la BHE, la administración debe ser intratecal, es decir, relativamente invasiva y no exenta de riesgo, especialmente si el paciente presenta escoliosis (Porensky & Burghes, 2013). Por el mismo motivo, la distribución del fármaco a los tejidos periféricos es escasa. Así mismo, el tratamiento puede provocar trastornos de la coagulación y toxicidad renal.

Evrysdi™ (Risdiplam) es una molécula pequeña que actúa sobre el corte y empalme del transcrito de *SMN2* promoviendo la inclusión del exón 7. Es capaz de unirse, por un lado, al sitio de corte y empalme localizado en la porción proximal del intrón 7 (5'ss) y, por otro, a la secuencia ESE2 presente en el exón 7. Estas uniones favorecen el correcto reclutamiento del espliceosoma y la inclusión del exón en el transcrito final (Sivaramakrishnan *et al.*, 2017; Ratni *et al.*, 2018). En los ensayos clínicos, Risdiplam ha demostrado una alta efectividad a la hora de mejorar la función motora, reducir la necesidad de ventilación asistida e incrementar la supervivencia en los pacientes tipo I-III, especialmente cuando se aplica precozmente (Dhillon, 2020; Baranello *et al.*, 2021). Presenta varias ventajas respecto a Zolgensma® y Spiranza®: su coste es sensiblemente menor y es capaz de permear la BHE, por lo que su aplicación puede ser por vía oral en el domicilio, sin técnicas invasivas y con una distribución del fármaco tanto a nivel periférico como en el SNC (Ratni *et al.*, 2018).

4.2. Terapias complementarias

El hecho de que los abordajes terapéuticos previamente descritos presenten una mayor efectividad cuando se aplican en fase presintomática pone de manifiesto la necesidad de incrementar los niveles de SMN durante la ventana temporal de altos requerimientos. Sin embargo, la posibilidad de un inicio tardío en la administración, la presencia de efectos adversos que impidan su administración, así como su precio prohibitivo, hace necesario el desarrollo de nuevas terapias complementarias al incremento de SMN que puedan modular la severidad de los síntomas e incrementar la calidad de vida de los pacientes. En este sentido, han cobrado especial relevancia las estrategias terapéuticas dirigidas a la neuroprotección y a potenciar la función motora.

Distintas drogas neuroprotectoras están siendo objeto de estudio para su aplicación en la AME. Algunas de ellas, como la gabapentina y el riluzole, están ya en fase de ensayos clínicos al estar aprobadas para otras patologías. Sin embargo, aunque aún siguen en fase de estudio, los ensayos no han mostrado una alta efectividad (Merlini *et al.*, 2003; Ojala *et al.*, 2021). También están siendo estudiadas drogas que potencian o mimetizan el efecto de factores tróficos neurales, especialmente BDNF, IGF-1 y agrina. Entre estas drogas, destacan por su efecto sobre la función motora en modelos murinos de AME la loganina (un glucosido iridoide), IPLEX (IGF-1 recombinante humana) y NT-1654 (una variante resistente a la degradación de la forma neural de agrina) (Murdocca *et al.*, 2012; Tseng *et al.*, 2016; Boido *et al.*, 2018). Sin embargo, debido al limitado efecto sobre la supervivencia que presentan, la visión actual de la estrategia de neuroprotección va encaminada a la coadministración con otras drogas para maximizar los beneficios terapéuticos (Ojala *et al.*, 2021).

Otra estrategia de tratamiento consiste en mejorar el estado y la función motora. A nivel muscular, dos dianas terapéuticas parecen prometedoras: la miostatina y la troponina. La miostatina es una proteína de expresión predominantemente muscular que regula negativamente el crecimiento y tamaño muscular (Lee & Mcpherron, 2001). Estudios en un modelo murino de AME han mostrado que la administración temprana y tardía de una variante del anticuerpo monoclonal SRK-015 (que bloquea la síntesis de miostatina) incrementa la masa muscular y la función motora (Long *et al.*, 2019). La activación de la troponina también parece tener potencial terapéutico en estudios preclínicos. Por ejemplo, la administración de un activador de la troponina, el Reldesemtiv, en conjunción con Nusinersen parece incrementar la fuerza muscular en el modelo murino de AME Taiwanés, aunque los resultados aún no han sido publicados.

Por último, el efecto de distintas moléculas que afectan a los canales de potasio y calcio dependientes de potencial han mostrado efectos de interés a nivel de la NMJ en modelos murinos de AME (Tejero, 2016; Tejero *et al.*, 2020; Simon *et al.*, 2021).

Hipótesis y Objetivos

En neuronas en cultivo SMN se transporta por el axón en forma de gránulos que contienen ARNm y proteínas de unión a ARNm (Fallini *et al.*, 2011, 2014; Donlin-Asp *et al.*, 2017; Price *et al.*, 2018). Así mismo, se ha demostrado la presencia de SMN en las terminaciones presinápticas de la NMJ durante el periodo perinatal (Dombert *et al.*, 2014). Nuestra hipótesis de partida es que **durante el periodo de maduración sináptica se produce traducción local en el terminal presináptico y que SMN participa en este proceso**. Así mismo, postulamos que **la sobreexpresión de SMN2 puede dar lugar a la acumulación de proteína SMN en los terminales**, cuya persistencia en el tiempo puede verse aumentada por las alteraciones citoesqueléticas que se producen tanto en los axones como en los terminales motores en AME.

Por otro lado, postulamos **que las alteraciones funcionales en los terminales motores en los modelos de AME**, como son el déficit en la neurotransmisión y la alteración en el reciclado de las vesículas sinápticas (Kariya *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2012), se producen **en el contexto de la pérdida en la homeostasis del calcio y que la mitocondria participa en este proceso**. También proponemos que **el déficit en la neurotransmisión puede ser aminorado mediante potenciadores farmacológicos de los canales de calcio dependientes de potencial**.

Partiendo de las hipótesis expuestas previamente, en el presente trabajo establecimos los siguientes **objetivos generales**:

1. Determinar la organización de SMN y su posible asociación con el citoesqueleto y con elementos de la maquinaria de traducción local en los terminales presinápticos motores durante la maduración postnatal sináptica en ratones silvestres y en modelos de AME.
2. Investigar los posibles mecanismos implicados en el déficit funcional de los terminales presinápticos motores
3. Investigar el posible efecto de un potenciador de la neurotransmisión en AME.

Para abordar estos objetivos, establecimos los siguientes **objetivos específicos**:

- 1.1. Definir las características de los granos de SMN en axones y terminales presinápticos motores en ratones silvestres y modelos de AME.
- 1.2. Determinar el curso temporal de la expresión de SMN en axones y terminales presinápticos motores durante la maduración postnatal.
- 1.3. Determinar la relación entre el citoesqueleto y los granos de SMN en axones y terminales presinápticos motores.
- 1.4. Determinar el impacto de la sobreexpresión de SMN en los modelos murinos AME.
- 1.5. Estudio de la posible relación de SMN con elementos de la maquinaria de traducción local en el terminal nervioso motor durante la maduración postnatal.
- 2.1. Determinar la afectación de la exo- y endocitosis en el modelo de AME Taiwanés y la posible implicación de la mitocondria en el déficit funcional del terminal.
- 2.2. Investigar los mecanismos que median el déficit en el incremento de calcio en la matriz mitocondrial y su posible implicación funcional en los terminales presinápticos motores en AME.
3. Determinar el efecto sobre la neurotransmisión de un modificador de los canales de calcio dependiente de potencial en ratones controles y deficientes en SMN.

Materiales y Métodos

1. Modelos animales

Para este trabajo se han utilizado 4 modelos murinos con base genética en la cepa FVB/N, Por un lado, ratones silvestres para el estudio de las características fisiológicas del citoesqueleto y de la proteína SMN (Fig. 10A) y, por otro, tres modelos de AME; el modelo “SMA Δ 7” (Fig. 10B, panel izquierdo), el modelo “Taiwanés” (Fig. 10B, panel derecho) y el modelo “Taiwanés/SypHy”. Los ratones se mantuvieron en condiciones estándares (12:12 horas luz:oscuridad y alimentación *ad libitum*) en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación vigente según las directrices del Consejo Europeo sobre Cuidado de Animales de Laboratorio.

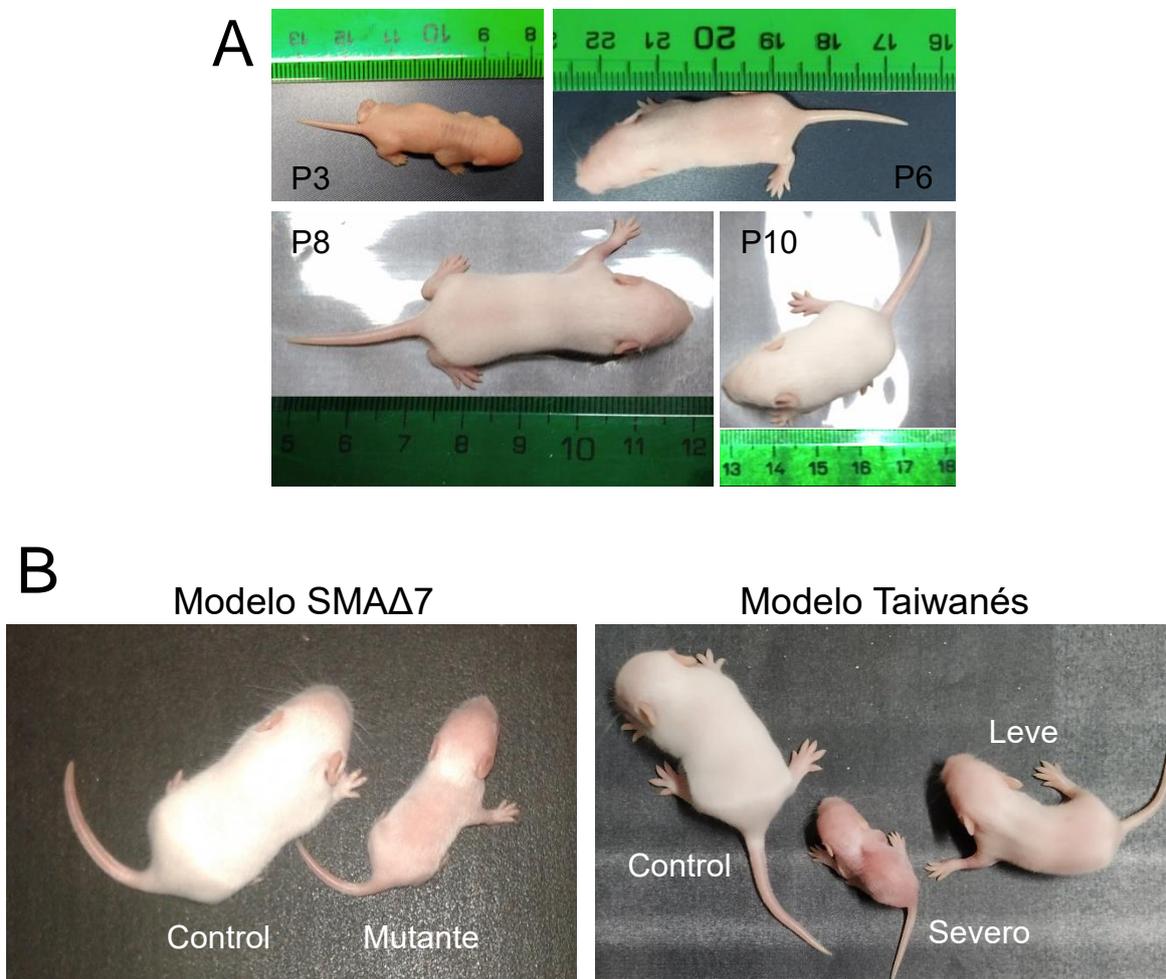


Figura 10. Modelos murinos. **A.** Ejemplos representativos de ratones silvestres a distintas edades postnatales (P3, P6, P8 y P10). **B.** Diferencias morfológicas a P9 entre ratones controles y mutantes en el modelo murino SMA Δ 7 (izquierda) y Taiwanés (derecha). Nótese que en modelo Taiwanés los ratones mutantes pueden presentar un fenotipo severo o leve.

1.1. Características de los modelos murinos de AME

1.1.1. Modelo SMA Δ 7

El modelo SMA Δ 7 fue desarrollado por Le y colaboradores (Le *et al.*, 2005) y fue cedido a nuestro laboratorio por el Prof. Arthur Burghes (Department of Molecular Genetics, College of Biological Sciences, The Ohio State University, Columbus, OH, USA) y por el Prof. Jordi Calderó (Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Lleida e Instituto de Investigación Biomédica de Lleida). El modelo se caracteriza por tener interrumpido el gen *Smn* murino a nivel del exón dos y expresar dos transgenes humanos en homocigosis: *SMN2* (dos copias) y *SMN Δ 7* (seis copias). El transgén *SMN Δ 7* produce exclusivamente proteína SMN trunca

La colonia se mantuvo mediante cruces de parejas portadoras de *Smn* en heterocigosis (*Smn*^{+/-}, *SMN2*^{+/+}, *SMN Δ 7*^{+/+}; Fig. 11). Las camadas obtenidas presentaron tres genotipos (Tabla II): animales controles, mutantes y heterocigotos. Estos últimos se emplearon para el mantenimiento de la línea.

Para los experimentos se emplearon ratones controles y mutantes con una edad comprendida entre los 9 y los 11 días postnatales (P9-11). La identificación de los mismos se realizó mediante PCR (ver más adelante).

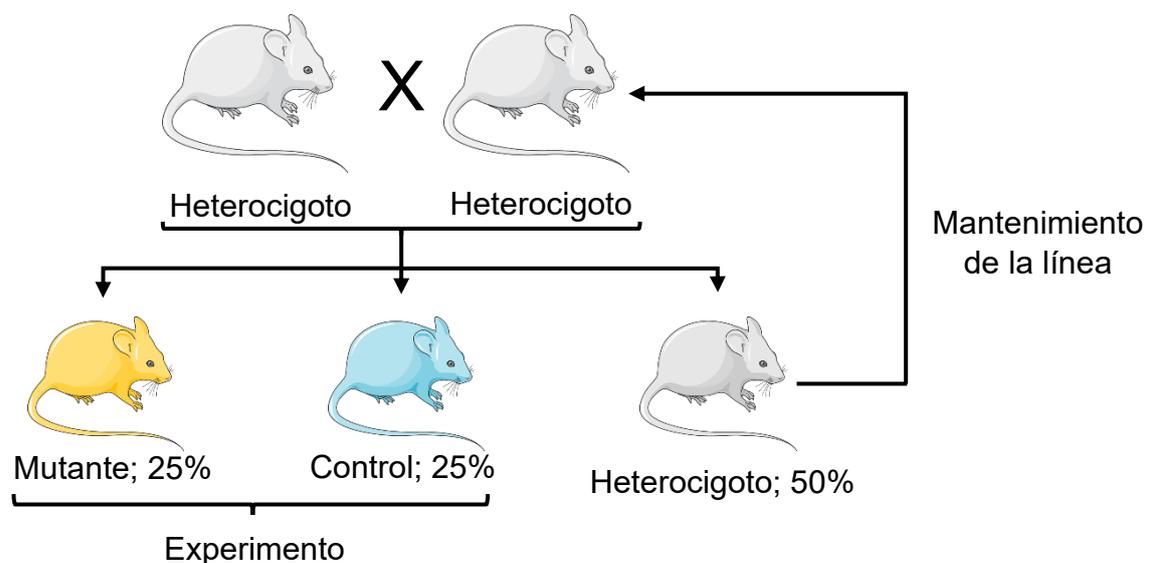


Figura 11. Esquema de cruces y destino de los ratones en el modelo SMA Δ 7.

Tabla II. Genotipos y destino de los ratones del modelo SMA Δ 7.

Nombre	Gen <i>Smn</i>	Transgén <i>SMN2</i>	Transgén <i>SMNΔ7</i>	Destino
Heterocigoto	+/-	+/+	+/+	Mantenimiento de la línea
Mutante	-/-	+/+	+/+	Experimento
Control	+/+	+/+	+/+	Experimento

1.1.2. Modelo Taiwanés

El modelo de AME Taiwanés fue desarrollado por Hsieh-Li y colaboradores (Hsieh-Li *et al.*, 2000) y fue adquirido directamente a los laboratorios Jackson (The Jackson Laboratory, Ref.: #005058). Se caracteriza por presentar una mutación en el exón siete del gen *Smn* murino que hace inviable la traducción de la proteína murina y contener el transgén humano *SMN2*. Una característica especialmente interesante del modelo es que los animales nulos para el gen *Smn* muestran diferente severidad fenotípica. Los animales hemicigotos para *SMN2* presentan dos fenotipos (Fig. 10B). Severo, no superan los 2 g de peso corporal, presentan una importante afectación motora y sobreviven menos de 10 días. Leve, con menor afectación en peso, mejor función motora y con una supervivencia máxima menor a 15 días (véase *Resultados*). Por otro lado, los homocigotos positivos para *SMN2*, con cuatro copias del transgén, son viables y fértiles, aunque desarrollan necrosis de la cola y las orejas.

Tabla III. Genotipos y destino de los ratones del modelo Taiwanés.

Crías del Cruce Experimental			
Nombre	Gen <i>Smn</i>	Transgén <i>SMN2</i>	Destino
Mutante	-/-	+/0	Experimento
Control	+/-	+/0	Experimento y cruce de mantenimiento

Crías del Cruce Mantenimiento			
Nombre	Gen <i>Smn</i>	Transgén <i>SMN2</i>	Destino
Sin cola	-/-	+/+	Cruce experimental
Heterocigoto	+/-	0/0	Cruce experimental
Otros genotipos	+/+	+/+	Sacrificio
	+/-	+/+	Sacrificio
	+/+	+/0	Sacrificio
	+/-	+/0	Sacrificio
	-/-	+/0	Sacrificio
	+/+	0/0	Sacrificio
	-/-	0/0	No nace

1.1.3. Modelo Taiwanés/SypHy

En una serie de experimentos se empleó una variante del modelo Taiwanés, la línea Taiwanés/SypHy. Este modelo se obtuvo mediante el cruce de la línea Taiwanés y la línea SypHy, generada en nuestro laboratorio (Cano, 2014), que se caracteriza por expresar el transgén *SypHy*. Este transgén codifica a la proteína sinaptofisina fusionada en su dominio intravesicular a la fluorina, una GFP supereclíptica dependiente de pH. Las fluorinas fluorescen en ambientes con un pH > 6 (Fig. 13) y se apaga en ambientes de mayor acidez (Sankaranarayanan *et al.*, 2000). Esta propiedad permite realizar registros dinámicos de la actividad exo-endocítica en la sinapsis (Tabares *et al.*, 2007; López-Manzaneda *et al.*, 2021).

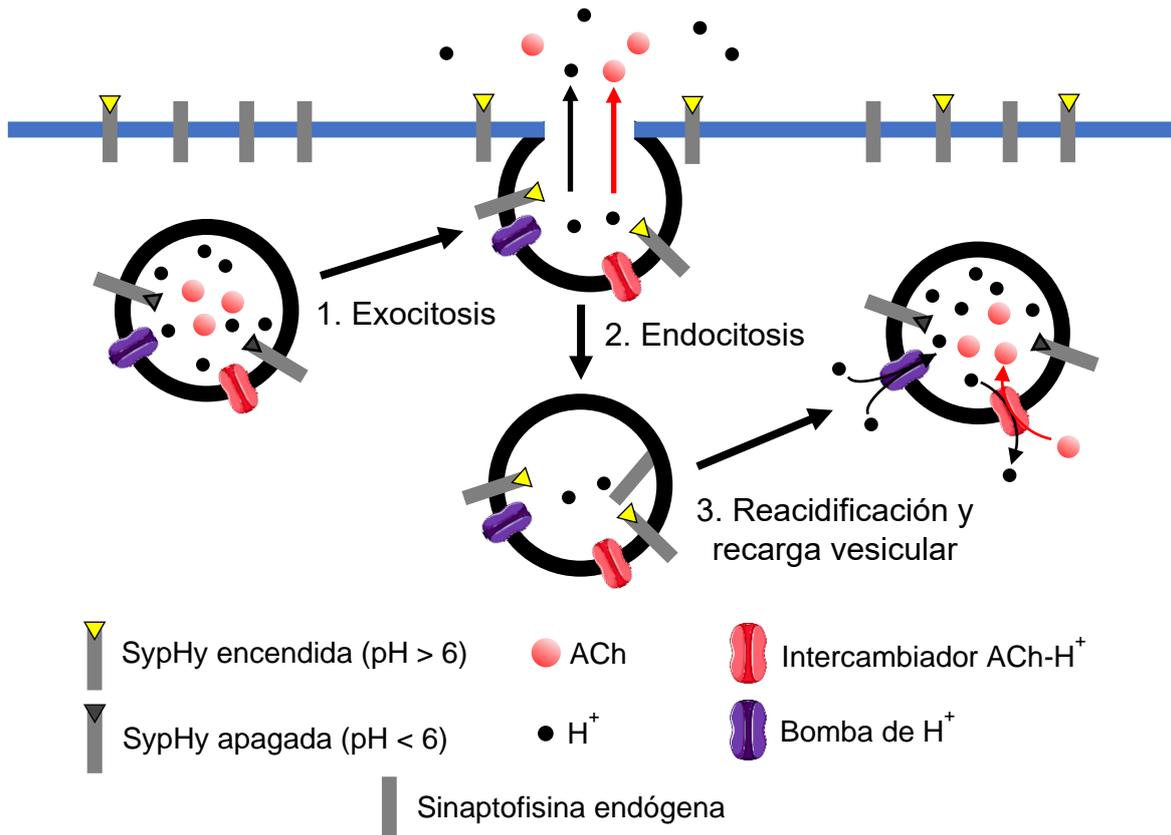


Figura 13. SypHy como indicador de la exo- endocitosis en tiempo real. El ambiente ácido propio del interior de las vesículas sinápticas (≈ 4) impide que la pfluorina fluoresca, pero al producirse la exocitosis (1) el interior de la vesícula se expone al pH del medio extracelular (≈ 7.4) y el fluoróforo se enciende. Al endocitarse SypHy (2), la nueva vesícula vuelve a acidificarse (3) y la fluorescencia se apaga. El encendido y apagado de SypHy indican, por tanto, la exocitosis y la endocitosis, respectivamente, y permite estudiar en tiempo real ambos procesos. Nótese que existe una pequeña cantidad de SypHy en la membrana plasmática, lo que permite, además, una mejor identificación al microscopio de los terminales en reposo. Syphy: Sinaptofisina-fluorina, ACh: Acetilcolina, H⁺: Protones. Adaptada de Sankaranarayanan *et al.*, 2000.

1.2. Genotipado de las líneas experimentales

El genotipado de los animales de experimentación, así como el de los animales de mantenimiento de las líneas, se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de biopsias digitales o caudales. Las resecciones se emplearon para la identificación posterior de los animales, siguiendo el código indicado en la Figura 14.

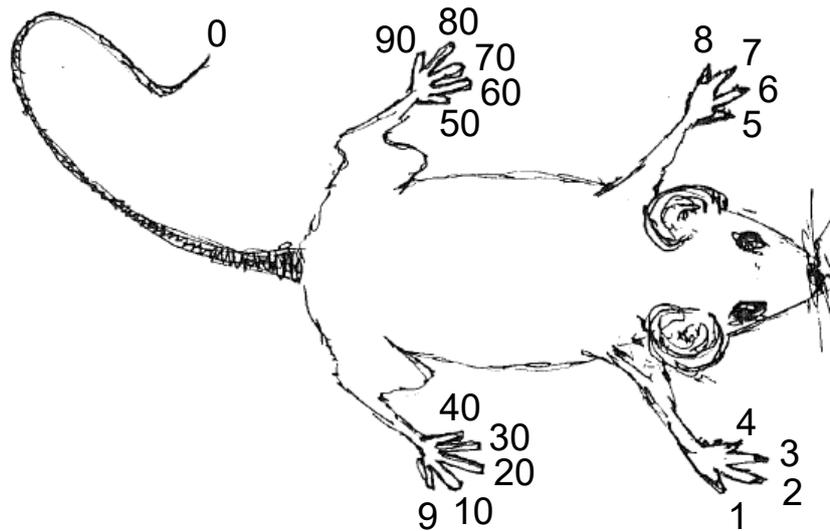


Figura 14. Código de identificación de los ratones. La biopsia de los dedos de los miembros anteriores y el quinto dedo del pie derecho indican las unidades. El resto de dedos indican las decenas. El extremo distal de la cola sirve de unidad nula. Como ejemplo, un código 66 vendría indicado por la exéresis del segundo dedo de la mano izquierda (valor 6) y el mismo dedo del pie izquierdo (valor 60).

1.2.1. Protocolo de extracción de ADN

Tras la resección del tejido, la muestra se centrifugó con una centrífuga de mesa (Eppendorf, modelo 5424) a 14000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente. A continuación, se le añadió 50 μ l de solución de lisis alcalina (25 mM NaOH; 0,2 mM EDTA) y se sometió a un choque térmico en un termobloque (Thermomixer Compact, Ref. 05-400-200, EppendorfTM) a una frecuencia de mezcla de 1000 rpm y 65 °C durante 30 minutos seguidos de otros 18 minutos a 98 °C, lo que permitió la rotura y disgregación del tejido. El tubo conteniendo la muestra lisada se colocó en hielo durante un minuto para evitar la evaporación y se añadió 50 μ l de solución tampón (40 mM Tris-HCl, pH 4) para neutralizar la alcalinidad. Finalmente, las muestras se centrifugaron de nuevo a 14000 rpm durante un minuto y se recolectó 50 μ l de sobrenadante de cada tubo, rico en material genético, conservándose a 4 °C.

1.2.2. Técnica de PCR y electroforesis en gel

Los ADN de interés se detectaron mediante PCR mediante un termociclador (Heal Force B960 Thermal Cycler) siguiendo los siguientes protocolos:

Línea SMA Δ 7

En este modelo no es necesario el genotipado de los transgenes *SMN2* y *SMN Δ 7* puesto que ambos se encuentran en homocigosis, por lo que solo se realizaron estos como control interno en ocasiones. El gen murino *Smn* se genotipó como se detalla a continuación.

➤ Cebadores

Para la amplificación del gen *Smn* se emplearon los cebadores NeoB (alelo mutante), A2F (alelo silvestre) y A2R (ambos alelos) (véase Anexo I: datos técnicos de los cebadores empleados).

➤ Composición de la mezcla de reacción:

15,1 μ l de H₂O desionizada y autoclavada

4 μ l de MgCl₂ (25 mM)

2 μ l de Tampón 10X (Biotools; Ref.: 10043)

1 μ l de cada cebador: A2R y NeoB (30 μ M)

0,2 μ l del cebador A2F (30 μ M)

0,5 μ l de mezcla de dNTPs (25 mM; Invitrogen)

0,2 μ l de ADN polimerasa recombinante de *Thermus sp*, clonada en *E.coli* (Biotools; Ref.; 10043)

2,5 μ l de sobrenadante rico en ADN

➤ Protocolo de termociclado:

- | | |
|-----------------------|-----------|
| 1. 95°C – 4 minutos | 35 ciclos |
| 2. 95°C – 90 segundos | |
| 3. 63°C – 90 segundos | |
| 4. 72°C – 90 segundos | |
| 5. 72°C – 4 minutos | |
| 6. 4°C | |

Una vez finalizada la PCR, se reveló el resultado de la amplificación del ADN mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% (m/v). Para detectar el ADN amplificado, se añadió al gel RedSafe™, un intercalante fluorescente de ADN (Ref. 21141, Labotaq), a una concentración del 0,005%. Finalmente, se realizó la electroforesis de las muestras durante 25 minutos a un voltaje constante de 90 V. En la Figura 15A se muestra un ejemplo del patrón de bandas para cada genotipo.

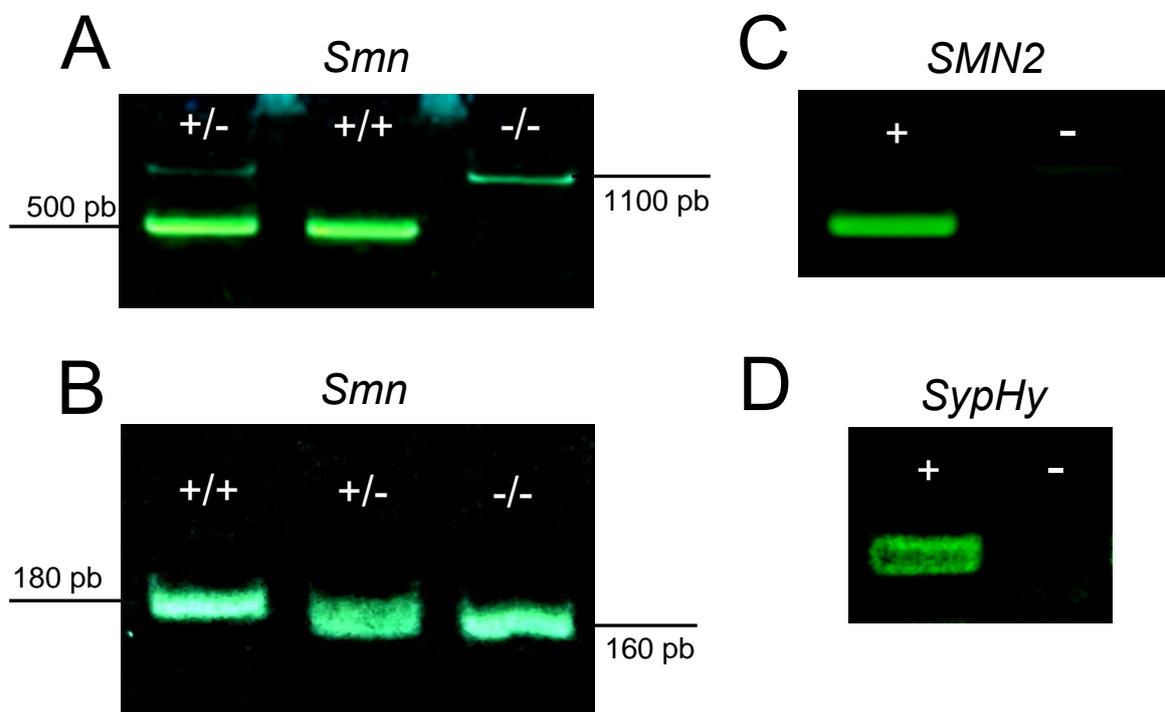


Figura 15. Revelado de los genotipos mediante electroforesis. A y B. Ejemplos de muestras *Smn* (+/-), (+/+) y (-/-) en los modelos SMAΔ7 (A) y Taiwanés (B). El tamaño de las bandas se muestra en los márgenes. C y D. Ejemplos de lecturas de los transgenes *SMN2* (C) y *SypHy* (D).

Línea Taiwanesa

En este modelo no es necesario el genotipado del transgen *SMN2* en las camadas experimentales ya que, debido al diseño del cruce, todas las crías son hemicigotas. En cambio, sí se realizó en las camadas de los cruces de mantenimiento. El gen murino *Smn* se genotipó como se detalla a continuación.

➤ Cebadores:

Para la amplificación del gen *Smn* se emplearon los cebadores TGC (alelo mutante), GCG (alelo silvestre) y AGC (ambos alelos) (véase Anexo I: datos técnicos de los cebadores empleados).

➤ Composición de la mezcla de reacción:

10,8 µl de H₂O desionizada y autoclavada

4 µl de MgCl₂ (25 mM)

2,5 µl de Tampón 10X (Biotools; 10043)

2 µl de cada cebador (10 µM)

0,5 µl de mezcla de dNTPs (25 mM; Invitrogen)

0,2 µl de ADN polimerasa recombinante de *Thermus sp.*, clonada en *E.coli* (Biotools; 10043)

1 µl de sobrenadante rico en ADN

➤ Protocolo de termociclado:

- | | | |
|-----------------------|--|-----------|
| 1. 95°C – 4 minutos | | 35 ciclos |
| 2. 94°C – 30 segundos | | |
| 3. 59°C – 30 segundos | | |
| 4. 72°C – 60 segundos | | |
| 5. 72°C – 2 minutos | | |
| 6. 4°C | | |

El revelado de la PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa del 3% (m/v). La electroforesis de las muestras se llevó a cabo durante 20 minutos a un voltaje constante de 90 V. En la Figura 15 se muestra un ejemplo del patrón de bandas resultantes para una muestra de animales de cada genotipo (Fig.15B)

Adicionalmente, para la identificación de heterocigotos en el mantenimiento de la línea se genotipó el transgén *SMN2*. Para la realización de este genotipado se siguió el siguiente protocolo.

➤ **Cebadores:**

Para la amplificación del transgén *SMN2* se emplearon los cebadores directo R3499 y reverso R3500. Con estos cebadores es posible detectar la presencia de transgén, pero no discriminar entre hemicigosis y homocigosis (Fig. 15C).

➤ **Composición de la mezcla de reacción:**

14,8 µl de H₂O desionizada y autoclavada

2 µl de MgCl₂ (25 mM)

2,5 µl de Tampón 10X (Biotools; 10043)

2 µl de cada cebador (100 µM)

0,5 µl de mezcla de dNTPs (25 mM; Invitrogen)

0,2 µl de ADN polimerasa recombinante de *Thermus sp.*, clonada en *E.coli* (Biotools; 10043)

1 µl de sobrenadante rico en ADN

➤ **Protocolo de termociclado:**

- | | |
|-----------------------|-----------|
| 1. 94°C – 3 minutos | 35 ciclos |
| 2. 94°C – 30 segundos | |
| 3. 65°C – 60 segundos | |
| 4. 72°C – 60 segundos | |
| 5. 72°C – 2 minutos | |
| 6. 4°C | |

El revelado de la PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa del 1 % (m/v). La electroforesis de las muestras se llevó a cabo durante 20 minutos a un voltaje constante de 90 V. En la Figura 15C se muestra un ejemplo del patrón de bandas resultantes para una muestra de animales con y sin transgén.

Línea Taiwanes-SypHy

En este modelo se siguió el mismo protocolo de genotipado del gen *Smn* que en la línea Taiwanesa. El transgén *SypHy* se genotipó como se detalla a continuación.

➤ **Cebadores:**

Para la amplificación del transgén *SypHy* se emplearon los cebadores directo, TSyphy F, y reverso, TSyphy R, (véase Anexo I: datos técnicos de los cebadores empleados). Con estos cebadores es posible detectar la presencia de transgén, pero no discrimina entre hemigiosis y homocigiosis (Fig. 15D).

➤ **Composición de la mezcla de reacción:**

17,8 µl de H₂O desionizada y autoclavada

2 µl de MgCl₂ (25 mM)

2,5 µl de Tampón 10X (Biotools; 10043)

0,5 µl de cada uno de los cebadores (10 µM)

0,5 µl de mezcla de dNTPs (25 mM; Invitrogen)

0,2 µl de ADN polimerasa recombinante de *Thermus sp.*, clonada en *E.coli* (Biotools; 10043)

1 µl de sobrenadante rico en ADN

➤ **Protocolo de termociclado:**

- | | |
|-----------------------|-----------|
| 1. 95°C – 5 minutos | 29 ciclos |
| 2. 95°C – 30 segundos | |
| 3. 62°C – 30 segundos | |
| 4. 72°C – 30 segundos | |
| 5. 72°C – 5 minutos | |
| 6. 4°C | |

El revelado de la PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa del 3% (m/v). La electroforesis de las muestras se llevó a cabo durante 20 minutos a un voltaje constante de 90 V. En la Figura 15D se muestra un ejemplo del patrón de bandas resultantes para una muestra de cada genotipo.

1.3. Fenotipado

Se estudiaron distintos parámetros fenotípicos de los ratones controles y mutantes, siguiendo las recomendaciones y protocolos de TreatNMD (<https://treat-nmd.org/treat-nmd-diseases/spinal-muscular-atrophy/>) con ligeras modificaciones. Desde el primer o segundo día postnatal (P1-2), se realizó una medición diaria entre las 10:00-13:00 h del peso corporal, la supervivencia y el reflejo de enderezamiento o “righting reflex”, tanto de ratones controles como de mutantes.

El test de enderezamiento es una prueba simple y rápida para evaluar las capacidades motoras en ratones. Se afecta por la debilidad en los músculos de las extremidades, los músculos del tronco y / o el mal estado general. En nuestro laboratorio medimos el tiempo que tardan los ratones en volverse sobre sus cuatro patas después de haber sido colocados en decúbito supino. La prueba se realizó por triplicado, con intervalos de 5 minutos de descanso para evitar la aparición de fatiga muscular. La duración máxima de cada medición fue de 30 segundos para evitar el sufrimiento innecesario del animal. Los tiempos obtenidos se promediaron. En general, los test no se prolongaron más allá del día postnatal 15 (P15).

2. Preparaciones neuromusculares y espinales

2.1. Materiales y soluciones de extracción y registro

Para las disecciones se empleó un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ1500) (Fig. 16B) y el siguiente material quirúrgico (Fine Science Tools; Fig. 16A):

- Dos pinzas Dumont N° 3 (Ref. 11231-30)
- Dos pinzas Dumont N° 55 (Ref. 11255-20)
- Una pinza Dumont N° 5SF (Ref. 11252-00)
- Tijeras (Ref. 14060-11)
- Microtijeras (Ref. 15019-10)

Durante la disección y extracción, las preparaciones se mantuvieron en todo momento bañadas por solución fisiológica extracelular (SFE) estándar (Tabla IV) con una osmolaridad comprendida entre 290-310 mOs/Kg. La solución estuvo constantemente gaseada con carbógeno (5% CO₂, 95% O₂) para mantener el pH en torno a valores fisiológicos (~7,35). En ciertos tipos de experimentos, la composición de la SFE se varió como se muestra en la Tabla IV.

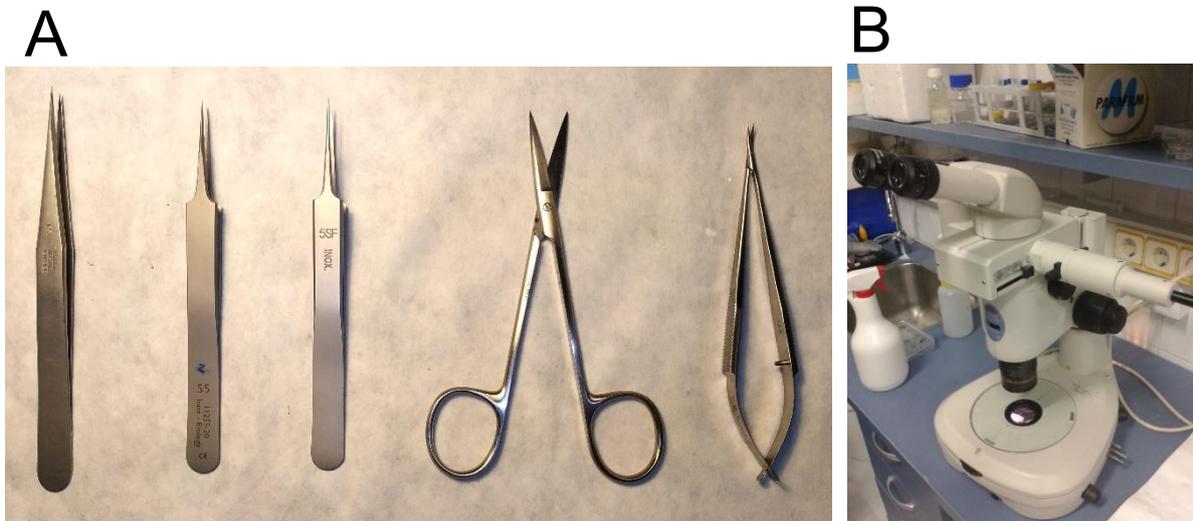


Figura 16. Material empleado en las disecciones neuromusculares. A. Instrumental de disección (de izquierda a derecha): pinzas N° 3, pinzas N° 55, pinzas N° 5SF, tijera y microtijera. **B.** Microscopio estereoscópico.

Tabla IV. Composición y uso de las soluciones fisiológicas empleadas. Las concentraciones de los compuestos se encuentran en mM.

Nombre	[NaCl]	[NaHCO ₃]	[KCl]	[MgCl ₂]	[CaCl ₂]	[Na ₂ HPO ₄]	Técnica
SFE estándar	135	12	5	1	2	0,330	Immunohistoquímica FISH Inmunotransferencia Electrofisiología Imagen dinámica
SFE sin calcio añadido	135	12	5	1	0	0,330	Immunohistoquímica FISH Imagen dinámica

2.2. Músculo elevador largo de la oreja

El músculo elevador largo de la oreja (*Levator auris longus*, LAL) es un músculo plano formado por fibras esqueléticas de tipo rápido. Es un músculo bilateral situado en la parte posterior del cuello, siendo el más externo de los músculos del cuello, insertándose medialmente a nivel de la línea media cervical y, lateralmente, a nivel de la base de cada pabellón auricular en su borde medial y medio-caudal. Está inervado por la rama auricular posterior del nervio facial (VII), la cual inicia su recorrido en el músculo por su borde caudal. Interviene fundamentalmente en la movilidad auricular, permitiendo la elevación de la oreja. Se divide morfológicamente en dos regiones, una rostral y otra caudal. La afectación del músculo en el modelo murino de la AME varía, siendo más resistente la región rostral y más vulnerable la región caudal (Ling *et al.*, 2012).

Para la disección del músculo, el ratón se sacrificó mediante exposición a CO₂ en una cámara cerrada tras lo cual se desangró mediante sección carotídea y masaje cardíaco. Posteriormente, se inmovilizó en decúbito ventral y se afeitó el cuello, desde el cráneo hasta el tórax. La disección comenzó con una sección transversal a nivel del cuello, lo más cercano al tórax posible para evitar dañar la inserción de los músculos craneales. Una vez contactada la columna vertebral se amplió el corte a ambos lados, para aislar la musculatura craneal del tórax, y se separó del hueso la musculatura del cuello y cráneo avanzando en sentido rostral. Finalmente, se seccionó lateralmente a cada pabellón auricular y transversalmente a la altura de la línea interocular, extrayéndose el bloque de músculos, junto con la piel.

El tejido extraído se colocó en una placa de Petri con la base cubierta de elastómero de silicona (Sylgar), de forma que la piel quedase en la base de la placa, se fijó mediante alfileres de 0,2 mm de diámetro, se añadió solución fisiológica extracelular y se procedió a la disección por planos del músculo con ayuda del microscopio estereoscópico.

Tras la retirada cuidadosa de la piel, respetando las regiones próximas a los pabellones auriculares, quedó un bloque central opaco donde se encuentra la línea media y las inserciones mediales de los músculos de ambos lados (Fig. 17; 1), dos masas laterales opacas que contienen la piel de los pabellones auriculares y las inserciones laterales de los músculos (Fig. 17; 2), y los músculos, translúcidos, entre los que se encuentra el LAL derecho e izquierdo (Fig. 17; 3).

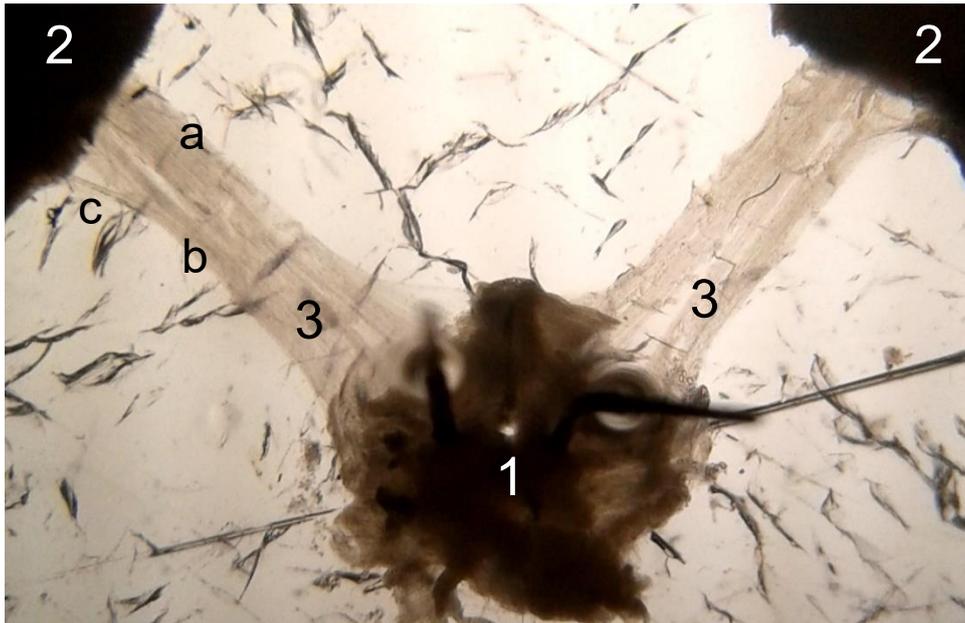


Figura 17. Disección bilateral del músculo LAL. A. Esquema del protocolo de disección del LAL y los distintos pasos a seguir en la disección por planos. B. Visión de ambos LAL mediante microscopía estereoscópica. Se ha retirado la piel y la musculatura profunda para su correcta identificación y visualización. La preparación cuenta con una masa central (1) que corresponde a las inserciones mediales de la musculatura posterior del cuello, dos masas laterales (2), que corresponde con piel y parte del cartílago auricular, y ambos músculos LAL (3). Nótese las regiones rostral (a) y caudal (b), así como la llegada del nervio facial al músculo (c).

Los distintos músculos en la región 3 se pudieron identificar por la dirección de sus fibras, la situación de sus inserciones y el plano en el que se situaban. Posteriormente, se pasó a diseccionar y retirar sucesivamente los músculos interescutular (*Interscutularis*), abductor largo de la oreja (*Abductor auris longus*) y auricular superior (*Auricularis superior*). Una vez aislado el LAL, se limpió bien de tejido conectivo y de tejido adiposo, teniendo especial precaución con no dañar el nervio.

2.3. Músculo transverso del abdomen

El músculo transverso del abdomen (*Transversus abdominis*; TVA) es un músculo bilateral plano compuesto mayoritariamente por fibras esqueléticas de tipo lento y que está especialmente afectado en la AME. Está situado en el plano más profundo de la región ventral de la pared abdominal, insertándose lateralmente en el borde inferior de la parrilla costal y medialmente en la línea alba. Está inervado por los nervios intercostales

procedentes de T7-T11, así como por los nervios iliohipogástrico e ilioinguinal (procedentes de L1), situándose los terminales nerviosos en el tercio muscular más cercano al reborde costal.

Para la disección del músculo, el ratón se sacrificó mediante decapitación y se desangró mediante masaje cardíaco. Posteriormente, se inmovilizó en decúbito dorsal y se retiró la piel abdominal. Se diseccionó toda la musculatura abdominal, retirando las vísceras abdominales y el diafragma, así como la caja torácica, mediante corte de las costillas en dirección paravertebral. El bloque de caja torácica y musculatura abdominal se colocó en una placa de Petri con Sylgar (Fig. 18), se añadió solución fisiológica extracelular y se fijó mediante alfileres de 0,2 mm.

La disección por planos se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico. Ésta se inició con un corte en la musculatura superficial de la parrilla costal a la altura del tercio medio del esternón, tras lo cual se prolongó el corte oblicuamente hasta el reborde caudal de la parrilla costal. Una vez hecho esto, se continuó el corte en dirección paralela a los nervios intercostales hasta alcanzar la arteria hipogástrica. Finalmente, se terminó de retirar el plano muscular superficial con un corte paralelo a la línea alba hasta el punto donde se realizó la incisión inicial.

Así, se dejó al descubierto una superficie triangular en la que se encuentra el TVA (Fig. 18). Caudalmente encontramos el músculo oblicuo interno del abdomen (OIA), que se puede diferenciar del TVA por las trayectorias de las fibras musculares (transversales y craneocaudales que se entrecruzan y transversales paralelas, respectivamente). Finalmente se limpió el músculo de tejido conectivo y adiposo.

Para la realización de registros electrofisiológicos y de imagen dinámica en el TVA, tras la disección y limpieza del tejido, se identificó, aisló y limpió la rama intercostal que lo inerva. Finalmente, el músculo se inmovilizó en una cámara de registro de metacrilato con un volumen de 3 ml, con base de Sylgar y un sistema intercambiador de solución.

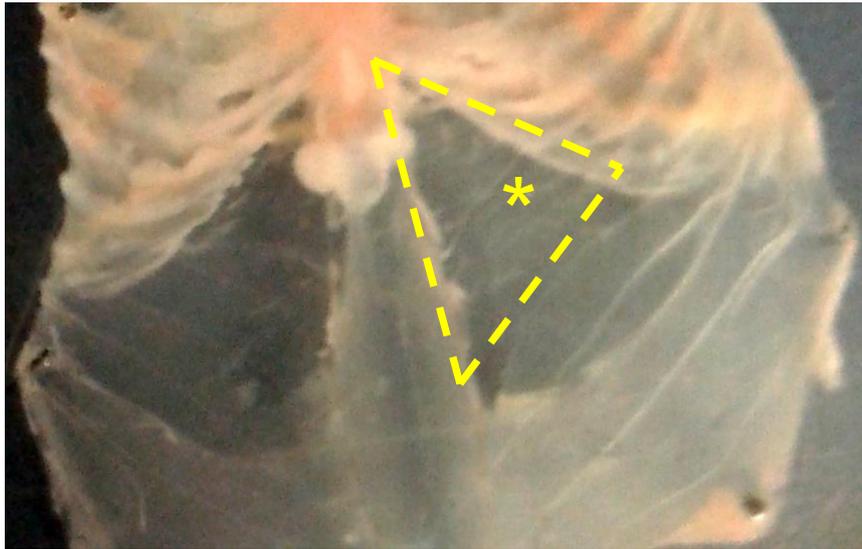


Figura 18. Disección del músculo TVA. Visión del TVA izquierdo (área señalada) a través del microscopio estereoscópico. Se ha retirado la piel y la musculatura superficial su correcta identificación visualización. Nótese el nervio intercostal que inerva la mayoría de las fibras del músculo (*).

2.4. Médula espinal

Para la disección de médula espinal, los ratones se sacrificaron mediante decapitación y se desangraron mediante masaje cardíaco. Posteriormente, se inmovilizaron en decúbito dorsal y se retiró la piel abdominal. Se retiró toda la musculatura abdominal, vísceras y diafragma, así como la caja torácica, mediante corte de las costillas en dirección paravertebral. En la columna vertebral se realizaron dos cortes paralelos a ambos lados del cuerpo vertebral y se prolongaron caudalmente hasta la región lumbar, concretamente hasta la zona de inserción del psoas. Así, se pudo retirar la cara ventral de la columna vertebral dejando a la vista el canal medular y la médula espinal. En función del experimento a realizar, se siguieron dos procedimientos de extracción de médula.

Por un lado, para la obtención de muestras para inmunotransferencia, se seccionó la médula a nivel de los segmentos intervertebrales C7-T1 y L2-L3 y se extrajo cuidadosamente la médula torácico-lumbar. La muestra se transfirió a una placa de Petri con Sylgar, se añadió solución fisiológica extracelular y se fijó mediante alfileres de 0,2 mm a nivel del extremo rostral. Posteriormente, se eliminaron cuidadosamente las

meninges, las raíces dorsales y la porción rostral que había sido fijada con pines. Finalmente, las muestras fueron sometidas a un proceso de extracción de proteínas (ver más adelante, *Inmunotransferencia*)

Por otro lado, para la obtención de tejido para inmunohistoquímica, se realizaron cortes transversales a nivel de los segmentos intervertebrales T13-L1 y L2-L3 y se extrajeron los segmentos L1-L2 de medula espinal. Una vez extraída, se inició la fijación del tejido (ver más adelante, *Inmunohistoquímica*).

3. Inmunohistoquímica

3.1. Preparaciones neuromusculares

Mediante inmunofluorescencia se estudió la expresión y distribución de las proteínas citoesqueléticas, SMN y proteínas relacionadas con el proceso de traducción local en los axones y terminales sinápticos motores presentes en los músculos TVA y LAL. El protocolo de marcaje inmunohistoquímico (IHQ) fue el siguiente:

1. Tras la disección del músculo, la preparación se mantuvo durante 30 minutos en solución fisiológica extracelular con carbógeno (95% O₂: 5% CO₂). A continuación, se cambió la solución por solución fisiológica sin calcio añadido, para evitar la exocitosis por parte del tejido nervioso, y se mantuvo en ésta 10 minutos.
2. Fijación por inmersión durante 90 minutos con paraformaldehído (PFA) al 4% preparado en PBS, manteniéndose a 4 °C. Después, se lavó el tejido 3 veces con PBS y se conservó en esta solución a 4 °C hasta el día siguiente.
3. Los músculos fueron colocados en una placa multipocillos y se incubaron en PBS con glicina 0,1 M durante 30 minutos. La glicina se une a los grupos aldehídos generados por la fijación con PFA, evitando así la aparición de autofluorescencia por las interacciones aldehído-proteína.
4. Permeabilización de las preparaciones mediante lavados seriados con Tritón X-100 en PBS (PBS-T) al 1% (v/v), primero dos lavados de 5 minutos, luego otros dos de 10 minutos y, finalmente, otros dos de 30 minutos.
4. Bloqueo de los sitios de unión inespecíficos para los anticuerpos mediante incubación con BSA al 5% (m/v) en PBS-T al 1%.
5. Incubación con los anticuerpos primarios (Tabla V) diluidos en una disolución de BSA al 2,5% en PBS-T al 1%. Se mantuvo incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, durante toda la noche a 4°C.
6. Tras 30 minutos a temperatura ambiente, la preparación se lavó con PBS-T al 0,05%, realizando primero tres lavados rápidos y después cinco lavados de 10 minutos.

7. Incubación con el el anticuerpo secundario (Tabla VI) diluido en una disolución de BSA al 5% en PBS-T al 0,05% durante una hora a temperatura ambiente. Además, se añadieron 0,5 µl/ml de bungarotoxina-rodamina (BTX-rho; Sigma-Aldrich, Ref. T0195) que se une a los receptores nicotínicos de acetilcolina y, por tanto, marca la placa postsináptica. A partir de este momento, las preparaciones se cubrieron con papel de aluminio para protegerlas de la exposición directa a la luz.

8. Lavados con PBS-T al 0,05%, primero durante 30 minutos y después se realizaron 6 de 10 minutos cada uno.

9. Finalmente, en una habitación oscura o con poca luz, el músculo se montó en un portaobjetos con ayuda de un microscopio estereoscópico. Se añadieron unos 10-15 µl de medio de montaje Slowfade (Invitrogen; Ref. S36936), se cubrió el músculo con un portaobjeto y se sellaron los bordes con laca de uñas. Todas las preparaciones se conservaron en cajas opacas a 4 °C.

3.2. Médula espinal

El proceso de fijación, procesamiento y tinción inmunohistoquímica de los segmentos lumbares (L1-L2) de las médulas espinales se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se detalla a continuación.

3.2.1. Criopreservación, criogenización y procesamiento de las muestras

Inmediatamente después de extracción de la región lumbar de la médula espinal, se procedió a su fijación por inmersión en PFA al 4% preparado en PBS, manteniéndose a 4 °C durante 4-6 h. Después, se lavó el tejido 3 veces con PBS y se dejó en esta solución a 4 °C. Entre las 24-48 h posteriores, las médulas se incubaron en PBS con sacarosa al 30% (m/v) a 4 °C durante 48-72 h para criopreservar el tejido. Posteriormente, las médulas fueron criogenizadas en Tissue-Tek® OCT™ (Ref. 4583, Sakura Finetek) mediante inmersión en isopentano ultrafrío por contacto con N₂ líquido. Los bloques resultantes se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento posterior en el criostato (Modelo HM 525, Microm International). Se realizaron cortes transversales secuenciales de 20 µm de espesor en los segmentos L1-L2 y se transfirieron series de 10 cortes a 10 portas. Los portaobjetos se conservaron a -80 °C hasta su tratamiento IHQ.

3.2.2. Tratamiento inmunohistoquímico

Para el marcaje IHQ de las proteínas de interés, todos los pasos se realizaron en una cámara húmeda. Tras el marcaje, las preparaciones se conservaron a 4 °C. El protocolo empleado fue el siguiente:

1. Permeabilización de los cortes mediante incubación con PBST al 0,5%. Se realizaron 3 incubaciones de 10 minutos cada una. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS.
2. Bloqueo de los sitios de unión inespecíficos mediante incubación con PBST 0.5% BSA 5% durante 1h a temperatura ambiente.
3. Incubación durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario (Tabla V) diluido en solución de bloqueo
4. Realización de 3 lavados de 10 minutos con PBS.
5. Incubación durante 2 h en oscuridad y a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido (1:500) en PBST 0,05% y BSA 2,5%. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS.
6. Finalmente, se realizó un lavado rápido de los cortes con agua destilada, se dejó secar, se añadió medio de montaje y se cubrieron y sellaron las preparaciones.

Tabla V. Anticuerpos primarios empleados.

Anticuerpo primario	Especie	Isotipo	Epitopo / Inmunógeno	Técnica	Concentración empleada	Casa comercial	Referencia
Anti-SMN	Conejo	Policlonal IgG	aa 1-195 SMN humano	IHQ/WB	1:200	Santa Cruz Biotechnologies	Sc-15320
Anti-NF-M	Ratón	Monoclonal IgG2a	No especificado	IHQ	1:250	Santa Cruz Biotechnologies	Sc-51683
Anti-MAP1B	Cabra	Policlonal IgG	Extremo N-terminal humano	IHQ	1:500	Santa Cruz Biotechnologies	Sc-8970
Anti-HuD	Ratón	Monoclonal IgG2a	aa 1-300 HuD humano	IHQ	1:250	Santa Cruz Biotechnologies	Sc-28299
Anti-CHAT	Cabra	Policlonal	No especificado	IHQ	1:250	Millipore	AB144P
Anti-Gemina2	Cabra	Policlonal IgG	Extremo C-terminal humano	IHQ	1:50 - 1:500	Santa Cruz Biotechnologies	Sc-7801
Anti-Gemina3	Ratón	Monoclonal IgG1	aa 368-548 Gemina3 humana	IHQ	1:50 - 1:500	Santa Cruz Biotechnologies	sc-57007
Anti-Cpg15	Cabra	Policlonal IgG	Extremo N-terminal humano	IHQ	1:50 - 1:500	Santa Cruz Biotechnologies	Sc-6870
Anti-vGLUT2	Conejo	Policlonal	aa 566-582 VGLUT2 rata	IHQ	1:200	Synaptic Systems	135 403
Anti-Tau	Conejo	Policlonal	No especificado	FISH	1:1000	Sigma	T6402
Anti-DIG	Ratón	Monoclonal IgG1	No especificado	FISH	1:500	Abcam	ab420

Tabla VI. Anticuerpos secundarios empleados.

Anticuerpo Secundario	Especie	Isotipo	Epítipo	Técnica	Concentración empleada	Casa comercial	Referencia
Anti-cabra Alexa-Flúor 647	Burro	IgG	No especificado	IHQ	1:500	Invitrogen	A21447
Anti-cabra Alexa-Flúor 488	Burro	IgG	No especificado	IHQ	1:500	Invitrogen	A11055
Anti-conejo CF 633	Burro	IgG	No especificado	IHQ	1:500	Biotium	20125
Anti-conejo Alexa-Flúor 594	Burro	IgG	No especificado	IHQ	1:500	Invitrogen	A21207
Anti-ratón CF 488A	Burro	IgG	No especificado	IHQ	1:500	Biotium	20014
Anti-ratón Alexa-Flúor 488	Cabra	IgG1 (H+L)	No especificado	IHQ/FISH	1:500	Thermo Fischer	A21121
Anti-conejo Cy3	Burro	IgG (H+L)	No especificado	FISH	1:500	Jackson	711-166-152

4. Inmunotransferencia de proteínas

4.1. Dispositivo experimental

Los elementos del dispositivo experimental empleados en los experimentos de inmunotransferencia fueron:

- Homoginizador (VWR, Pellet Mixer, Ref. 431-0100)
- Sonificador de baño (Kerry Ultrasonics)
- Centrifugador (Eppendorf, modelo 5810 R)
- Espectrofotómetro (Eppendorf, BioPhotometer plus)
- Moldes y peines para geles de acrilamida (Biorad; Fig. 19A)
- Cubeta de electroforesis (Biorad; Fig. 19B)
- Adaptador para electroforesis vertical (Biorad; Fig. 19B)
- Adaptador para transferencia proteica (Biorad; Fig. 19B)
- Cartuchos de transferencia (Biorad; Fig. 19C)
 - Sandwich
 - Esponjas
 - Papel de filtro
- Fuente de alimentación (Biorad, PowerPac basic power supply; Fig. 19D).
- Revelador (Millipore, Luminata Forte Western HRP substrate, Ref. WBLUF0100)
- Sistema de detección y adquisición de imágenes ChemiDoq MP+ (Biorad)

4.2. Procedimiento experimental

En el presente trabajo se han realizado inmunotransferencias de médula espinal torácica en controles, mutantes y ratones silvestres a distintas edades.

4.2.1. Extracción de proteínas

Una vez extraída la médula y eliminadas las meninges, se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml con 100 μ l de tampón de extracción RIPA (Tris 50 mM pH 7-8, NaCl 150 mM, SDS 0,1% (m/v), desoxicolato de sodio 0,5% (m/v), tritón X-100 1% (v/v), mezcla de inhibidores de proteasas (Roche) 1X) y se disgregó y homogeneizó mecánicamente y en hielo. Posteriormente, la muestra se mantuvo a 4 °C durante 20' para permitir la disgregación química de la misma. Tras ello, la muestra se sonicó por inmersión para romper las membranas y se centrifugó durante 20' a 10 °C y 11000 rpm con frenado de nivel 4. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas por el método Bradford.

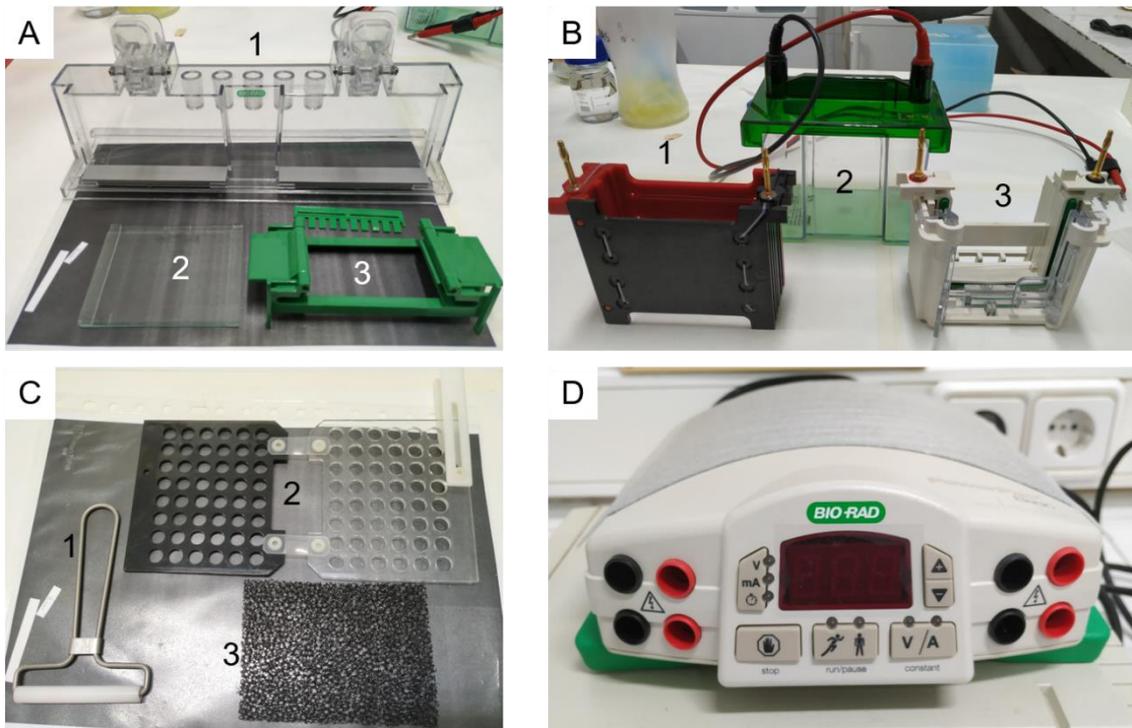


Figura 19. Instrumental empleado en la electroforesis en gel e inmunotransferencia. **A.** Sistema para la fabricación de gels. Consta de un soporte (1), dos placas de cristal que actúan como molde (2) y un adaptador con peines para fijar el molde de cristal y preparar los pocillos (3). **B.** Sistema de electroforesis que consta de un adaptador horizontal para membranas (1), una cubeta de electroforesis (2) y un adaptador vertical para gels (3). **C.** Elementos del cartucho de transferencia. Son necesarios un aplanador para eliminar burbujas entre la membrana y el gel (1), un sándwich para aproximar la membrana y el gel (2) y esponjas (3). **D.** Fuente de alimentación.

4.2.2. Electroforesis y transferencia de proteínas

Para la detección de las proteínas de interés, las muestras fueron sometidas a una electroforesis en gel de acrilamida al 10%. Pevio a la electroforesis, a las muestras se les añadió un tercio de su volumen de tampón de carga 4X (glicerol 50%, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4%, Azul bromofenol 0,8%, β -mercaptoetanol 5%) y se incubaron a 98 °C durante 4 minutos.

Finalmente, se cargaron los pocillos del gel con volúmenes idénticos y se sometió al gel a electroforesis en dos etapas: una primera etapa a 90 V durante 15 minutos y una segunda etapa a 130 V durante 30 minutos.

Para la transferencia de proteínas, las membranas de transferencia se recortaron a un tamaño similar al del cartucho de transferencia y se activaron mediante el siguiente protocolo:

1. 60 segundos de incubación en metanol.
2. Lavado de 5 minutos en agua desionizada.
3. 30 minutos de incubación en solución tamponadora de transferencia.

Una vez activadas, se montaron en los cartuchos de transferencia, sumergidos en solución tamponadora de transferencia, la membrana y el gel y se introdujeron en la cubeta de transferencia junto con un bloque de hielo. Finalmente se realizó la transferencia proteica aplicando una corriente fija de 240 mA durante 90 minutos.

4.2.3. Inmunomarcaje y revelado

A las membranas con proteínas se le aplicó un protocolo de inmunomarcaje consistente en:

1. Bloqueo de sitios de unión inespecíficos mediante incubación de la membrana en TBS con Tween al 1% (v/v; TBS-T 1%) y BSA al 3% (m/v). La incubación se prolongó durante una hora a temperatura ambiente.
2. Incubación de la membrana durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo.

3. Realización de 3 lavados de 10 minutos con TBS-T 1%. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario asociado a HRP, diluido en solución de bloqueo a una concentración final de 1:3000.

4. Realización de 3 lavados de 10 minutos con TBS-T 1%. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 5 minutos con el reactivo de revelado.

Las membranas se revelaron mediante sistema de detección ChemiDoq XRS con el software Quantity One® (Biorad). Las imágenes se tomaron mediante adquisición continua con los siguientes parámetros de exposición y adquisición:

- Exposición total: 300 segundos
- Inicio de exposición: 10 segundos
- N° de exposiciones: 30 imágenes

De las secuencias de imágenes obtenidas de esta forma, se seleccionaron aquellas correspondientes a la mayor intensidad y sin saturación ni artefactos.

5. Hibridación *in situ*

La técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) se llevó a cabo en preparaciones neuromusculares del músculo TVA procedente de ratones silvestres a P6. Simultáneamente, se llevó a cabo marcaje inmunohistoquímico complementario para identificar los axones y las uniones neuromusculares. La técnica FISH empleada en este trabajo consiste en la hibridación del ARN de interés con una sonda de oligonucleótidos específica de tipo LNA (ácido nucleico bloqueado), conjugada con el péptido digoxigenina (DIG) (Fig. 20). Una vez realizada la hibridación, el proceso seguido fue el de una inmunohistoquímica tradicional, siendo la proteína objetivo el péptido DIG. El protocolo empleado se expone a continuación.

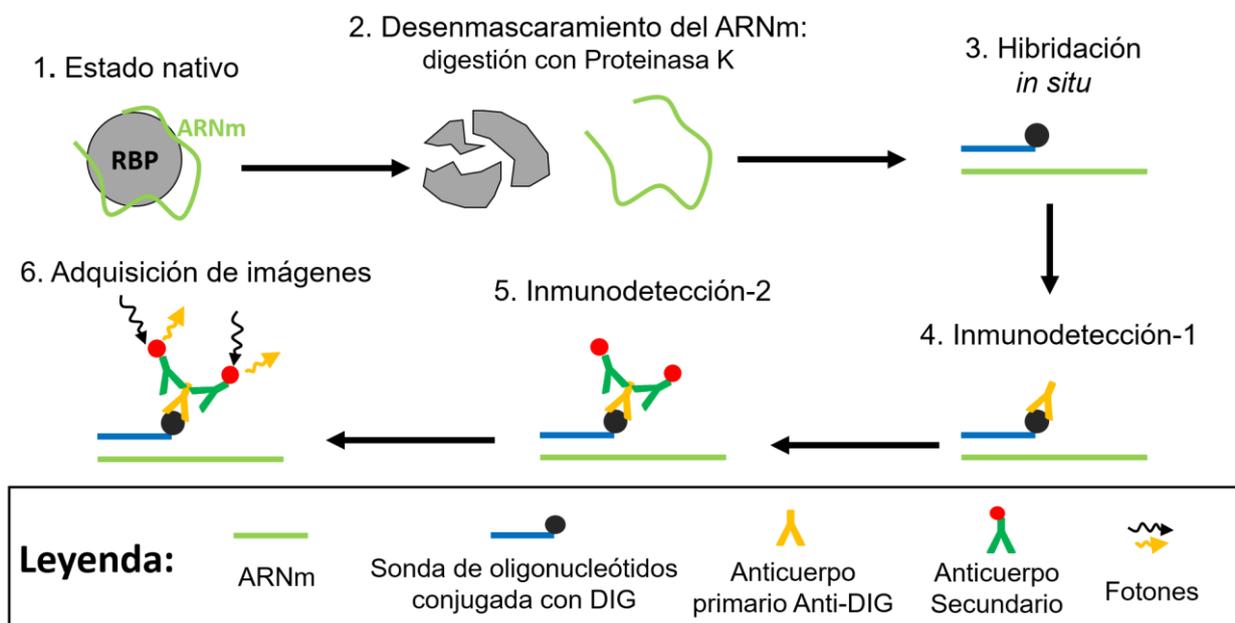


Figura 20. Esquema simplificado de la técnica FISH de tipo LNA. El ARNm en su estado nativo no es reconocible por la sonda debido a su asociación con una RBP (1). Por ello, debe tratarse el tejido con una proteínasa que desenmascare el transcrito (2). Así, el ARNm puede ser reconocido por la sonda (3) y puede iniciarse un protocolo de identificación de la sonda por IHQ o ICQ contra el péptido DIG (4-6).

1. Tras la disección de la preparación neuromuscular, ésta se mantuvo durante 30 minutos en solución fisiológica extracelular con carbógeno (95% O₂: 5% CO₂). A continuación, se cambió la solución por solución fisiológica externa sin calcio añadido durante 10 minutos.

2. El tejido se fijó por inmersión durante 90 minutos en solución fijadora periodato-lisina-paraformaldéhid (PLP; tampón de fosfato 50 mM pH 7,4, NaIO₄ 10 mM, lisina 75 mM, PFA 4%), manteniéndose a 4 °C. Debido a la potencial degradación del ARN presente en las preparaciones por acción de ARNasas exógenas, a partir de este momento todo el material empleado fue tratado con solución descontaminante RNase Away® (Ref. 83913, Sigma Aldrich), o bien habían sido tratado por el fabricante para eliminar dichas enzimas, y las manipulaciones de los reactivos y preparaciones se realizaron en ambientes libres de ARNasa (cabina de flujo laminar, incubadora exclusiva para experimentos de ARN, etc.). Después, se lavó el tejido 3 veces con PBS y se permeabilizó con PBS-T al 1% durante 90 minutos a temperatura ambiente.

3. Dado que los ARNm están enmascarados por proteínas de unión a ARNm, fue necesario realizar una digestión del tejido con proteasas para hacer accesibles los ARNm dianas. Por ello, para la detección de transcritos en las uniones neuromusculares, las preparaciones se incubaron con proteinasa K en PBST a una dilución final de 2 mg / ml durante 15 minutos a 37 °C.

4. Nueva fijación con PLP durante 20 minutos a temperatura ambiente y lavado con PBST al 0,1% durante 20 min.

5. Prehibridación para evitar uniones inespecíficas de la sonda de ARN. Para ello, la preparación se incubó durante 3 horas en tampón de hibridación HM (formamida 50%, tampón salino SSC de citrato de sodio 5X, triton-X 0,1%, ácido cítrico 9,2 mM, heparina 50 µg/ml, ARNt de E.coli 500 µg/ml) a la temperatura de hibridación (40 °C).

6. Incubación con la sonda contra 3'-UTR del transcrito de *β-actina* (Exiqon), diluida en HM a una concentración final de 40 nM, durante la noche a 40 °C.

7. Los músculos se transfirieron a una solución de SSC 2X con Triton-X 100 (SSCT) al 0.1% (v/v) mediante cuatro incubaciones sucesivas en HM / SSCT 2X (75% / 25%; 50% / 50%; 25% / 75%; 0% / 100%) de 15 minutos cada una y luego se lavaron con SSCT 0,2X durante 1 hora.

8. El mismo proceso se siguió para transferir a PBST 0.1%, con cuatro incubaciones graduadas sucesivas en SSCT 0,2X / PBST 0.1% (75% / 25%; 50% / 50%; 25% / 75%; 0% / 100%) de 15 minutos cada una.

Posteriormente, se realizó un marcaje inmunohistoquímico contra la proteína tau y el péptido DIG usando el protocolo estándar descrito anteriormente con modificaciones menores:

9. Bloqueo de los sitios de unión inespecíficos mediante incubación en PBS-T al 0,1% con suero de cabra al 10% (v/v) y BSA al 5% (v/v) durante 3 horas a temperatura ambiente.

10. Incubación con los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, durante 30 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBST al 0,1% de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.

11. Incubación con los anticuerpos secundarios, diluidos en solución de bloqueo con BSA al 2,5% (v/v) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBST al 0,1% de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.

12. Finalmente, en una habitación oscura o con poca luz, el músculo se montó en un portaobjetos con ayuda de un microscopio estereoscópico. Se añadieron unos 10-15 µl de medio de montaje Aqua Poly / Mount (Polysciences, Ref. 18 606) para cubrir el músculo y se selló la preparación con un cubreobjetos. Todas las preparaciones se conservaron en cajas opacas a 4 °C.

6. Registros Electrofisiológicos

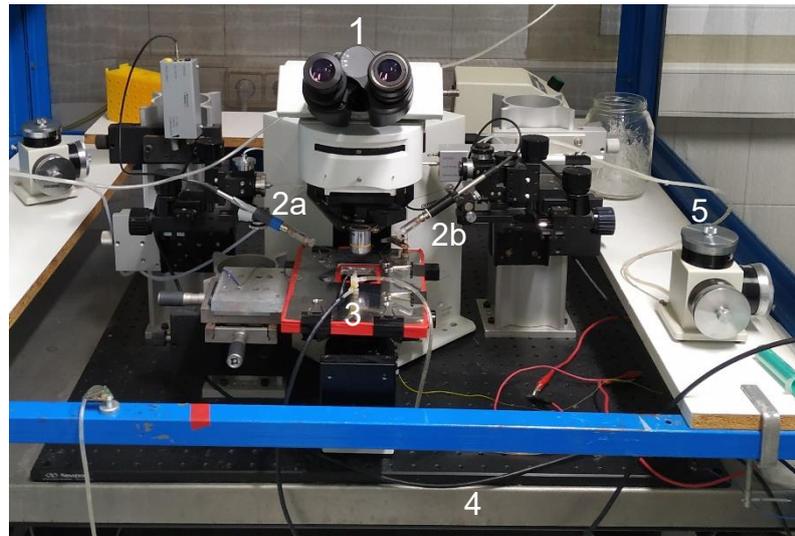
Los experimentos de registro intracelular mediante microelectrodos de vidrio se realizaron en el músculo TVA de ratones controles y mutantes Taiwaneses con edades comprendidas entre los 7-11 días postnatales. Todos los registros se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22-25 °C).

6.1. Dispositivo experimental

Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo los siguientes elementos:

- Microscopio de transmisión directa (Olympus, modelo BX50WI; Fig. 21A, 1)
- Cámarita de registro
- Sistema de intercambio de soluciones
- Sistema de gaseo de soluciones con carbógeno (5% CO₂, 95% O₂)
- Mesa antivibratoria (Newport; Fig. 21A, 4)
- Jaula de Faraday
- Electrodo de succión para la estimulación del nervio (Fig. 21B)
- Electrodo de registro (Fig. 21A, 2)
- Micromanipulador (Narishige, modelo MHV-3 (Fig. 21A, 5)
- Estimulador de pulsos aislados (AM-Systems, modelo 2100 (Fig. 21A, 6)
- Amplificador de registro intracelular (Npi electronic GmbH, modelo TEC-05X; Fig. 21A, 7)
- Interfase (PowerLab 4SP; Fig. 21A, 8)
- Estirador de vidrio horizontal (Sutter, modelo P-97; Fig. 21C)
- Ordenador y software Chart 5 para la adquisición y monitorización de señales (ADInstruments; Fig. 22)

A



6



7



8



B



C



Figura 21. Elementos del dispositivo experimental empleado en los registros electrofisiológicos. A. Visión general del dispositivo experimental y los dispositivos electrónicos que muestra el microscopio de transmisión directa Olympus BX50WI (1), los electrodos de registro (2a y (2b) y la situación del electrodo de succión del nervio (3), la mesa antivibratoria (4), el micromanipulador (5), estimulador de pulsos aislados (6), amplificador (7) e interfase (8). Imágenes 6-8 tomadas de www.a-msystems.com , www.npielectronic.de y AD Instruments, respectivamente. B. Detalle del electrodo de succión. C. Estirador de vidrio horizontal P-97. Tomada de www.sutter.com.

6.2. Procedimiento experimental

Tras la disección del músculo TVA (ver punto 2.2) junto con el nervio intercostal que lo inerva y se trasladó la preparación neuromuscular a la cámara de registro con solución fisiológica.

El nervio se estimuló mediante un electrodo de succión conectado a un estimulador de pulsos aislado mediante un cable coaxial. El electrodo de succión (Fig. 21B) se compone de dos hilos de plata clorurados (Ag-AgCl), que actúan como cátodo y ánodo para la estimulación del nervio. El cátodo se introdujo en un tubo de polietileno de aproximadamente 2 mm de diámetro interno que sirvió para atrapar el nervio. En el exterior del mismo tubo se enrolló el ánodo, teniendo especial cuidado que llegase al extremo final del tubo, en contacto con la solución de registro. Este dispositivo se montó sobre un imán que permitió su fijación a la pletina del microscopio y se acopló a un sistema de succión, compuesto por una jeringa, un tubo de polietileno y una llave de tres pasos.

Las micropipetas se fabricaron a partir de capilares de borosilicato con filamento incorporado (A-M Systems, diámetro externo: 1 mm, diámetro interno 0,75 mm) con un estirador horizontal configurado (Fig. 21C) con los siguientes parámetros:

- ♦ Calor: 540-730
- ♦ Velocidad 80
- ♦ Fuerza de estirado: 200
- ♦ Tiempo: 200

La resistencia de los microelectrodos fue de 10-25 M Ω una vez llenos con solución conductora de KCl 3 M. Las micropipetas se conectaron al seguidor de voltaje situado en la proximidad de la preparación mediante un electrodo de plata clorurado alojado en un porta-pipetas de metacrilato y, a su vez, conectado con la unidad central del amplificador de registro. Como electrodo de referencia se utilizó un hilo de plata clorurado conectado a tierra y en contacto con la solución de la cámara de registro. Para la penetración en las fibras musculares se empleó un micromanipulador (21A, 5).

Antes de bloquear la contracción e iniciar los registros se determinó el umbral de estimulación del nervio mediante pulsos cuadrados de 0,2 ms de amplitudes crecientes hasta apreciar bajo el microscopio la contracción de las fibras musculares. Para los

registros se utilizaron pulsos de al menos dos veces la amplitud umbral, normalmente de entre 1-15V.

La preparación se incubó durante con μ -conotoxina GIIIB (2-3 μ M, C-270, Alomone Laboratories), un bloqueante específico de los canales de sodio voltaje-dependientes musculares (Na_v 1.4) que inhibe la contracción muscular.

Una vez bloqueada la contracción, se procedió a realizar los registros intracelulares. Para ello se aproximó el electrodo de registro a la superficie de la fibra muscular, evidenciable por un aumento de la resistencia del electrodo, y se procedió a penetrar en la fibra mediante el penetrador eléctrico o manualmente con el micromanipulador.

Al comienzo de cada registro se aplicaron pulsos cuadrados de 200 pA y 5 ms de duración para posteriormente calcular la resistencia de entrada de la fibra muscular. A continuación, se registraron los potenciales evocados en respuesta a un tren de 100 pulsos a 0,5 Hz (ver más adelante). En función del experimento a realizar, se aplicaron el mismo número de potenciales de acción en trenes de pulsos a frecuencias mayores: 5, 10 y 20 Hz. En cualquier caso, entre trenes de estimulación en una misma fibra se esperó, al menos, 30 segundos.

6.3. Análisis de los registros electrofisiológicos

El análisis de la amplitud, frecuencia y cinética de los potenciales de placa evocados (EPP) y espontáneos o en miniatura (mEPP) de las fibras musculares se realizó con el programa Chart5 (Fig. 22).

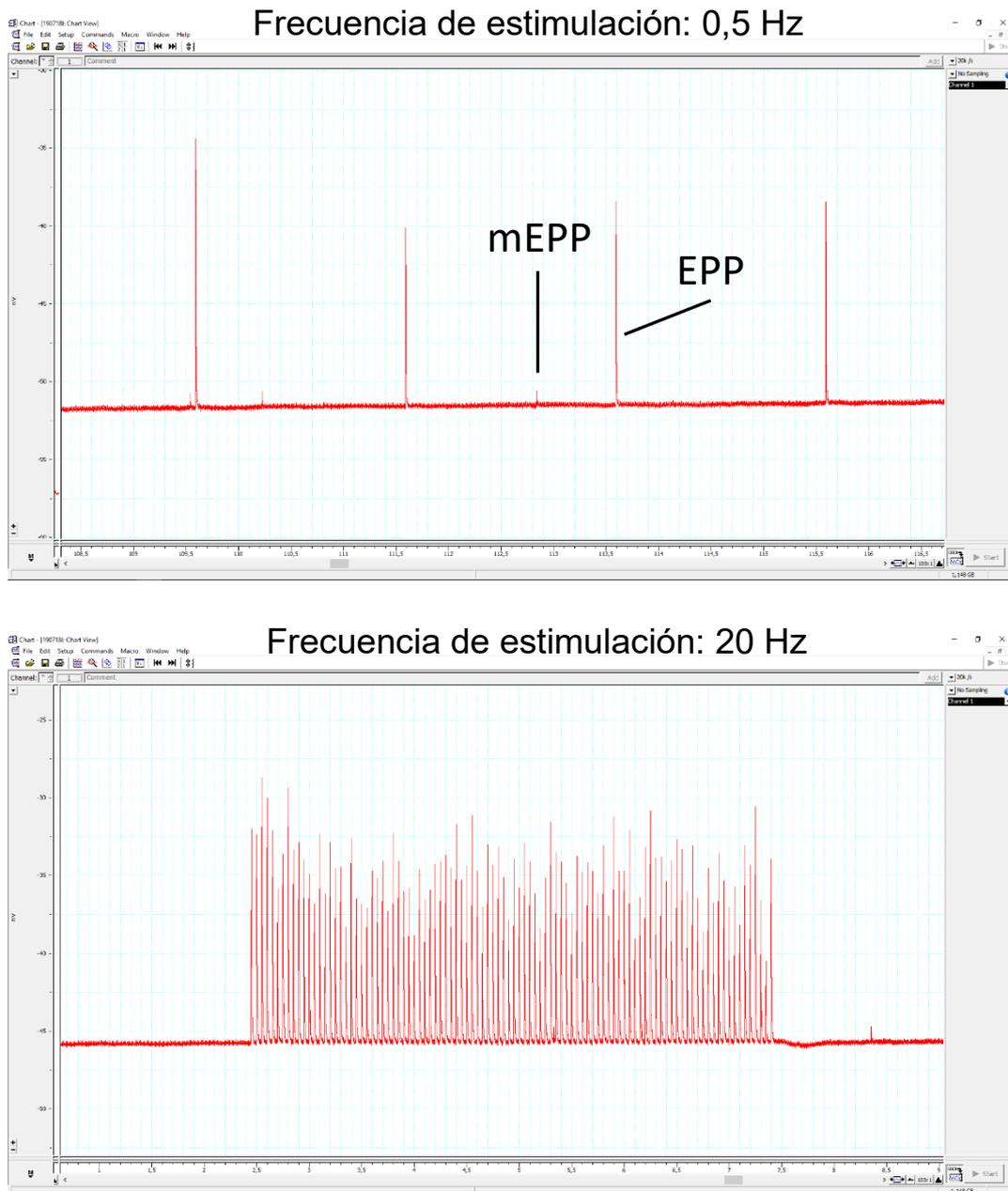


Figura 22. Registros electrofisiológicos con el programa Chart5. Ejemplos de registros mediante trenes de pulsos a 0,5 Hz (panel superior) y 20 Hz (panel inferior). A baja frecuencia se han señalado los de potenciales de placa evocados (EPP) y en miniatura (mEPP).

6.3.1. Análisis de la amplitud de los potenciales y del contenido cuántico

Inicialmente, la amplitud de los EPP (Fig. 23, 1) fue corregida por la sumación no lineal (Boyd & Martin, 1955; Kretschmannová & Zemková, 2004):

$$(1) \quad EPP_{cnl} = \frac{\text{amplitud EPP}}{1 - \frac{\text{amplitud EPP}}{-(V_m - E_r)}}$$

Donde EPP_{cnl} es la amplitud del potencial postsináptico corregida, V_m es el potencial de membrana registrado y E_r es el potencial de reversión de la corriente a través de los receptores de acetilcolina (en nuestro caso, se consideró E_r con un valor de -5 mV). Esta corrección no fue aplicada a los mEPP (Fig. 23, 2) puesto que éstos corresponden a liberaciones de una única vesícula y, por tanto, no se produce el fenómeno de sumación de potenciales. Tampoco se analizó la amplitud de los mEPP coincidentes con artefactos de contracción o EPPs.

A continuación, se calculó el factor de normalización, f , a un potencial de membrana en reposo de -70 mV (potencial de membrana teórico), siguiendo la siguiente fórmula:

$$(2) \quad f = \frac{-70 - E_r}{V_m - E_r}$$

Finalmente, se obtuvo la amplitud de los EPP corregida y normalizada ($EPP_{cnl\&70}$):

$$(3) \quad EPP_{cnl\&70} = f * EPP_{cnl}$$

Una vez normalizadas las amplitudes de los EPP y mEPP, se calculó el contenido cuántico (m ; número de cuantos que se liberan tras la llegada de un potencial de acción al terminal) siguiendo el método directo (Del Castillo & Katz, 1954):

$$(4) \quad m = \frac{\text{amplitud media EPP (mV)}}{\text{amplitud media mEPP (mV)}}$$

6.3.2. Análisis de mEPP

Se midió la frecuencia, la amplitud y la cinética de los mEPP. Para la frecuencia, se contabilizaron los eventos en registros de al menos 100 s, generalmente durante la estimulación a 0,5 Hz. La amplitud al pico obtenida se corrigió por el potencial de membrana como se mencionó anteriormente. Los parámetros cinéticos se determinaron igual que para los potenciales evocados y se explican en el siguiente apartado.

6.3.3. Análisis de los EPP

Se analizó tanto las amplitudes máximas como los parámetros cinéticos mediante el complemento “parámetros del pico” del programa Chart5.

Tiempo de subida (Fig. 23, 3): Corresponde al intervalo entre el instante en el que el EPP alcanza el 10% y el 90% de su amplitud máxima.

Ancho un-medio (FWHM o $T_{1/2}$; Fig. 23, 4): Corresponde al intervalo de tiempo comprendido entre el instante en el que el EPP alcanza el 50% de su amplitud máxima durante la fase de subida y la de bajada.

Constante de tiempo (τ) (Fig. 23, 5): Equivale al tiempo que tarda la señal en decaer un ~63,21 % de su amplitud máxima ($(1-e^{-1}) \cdot 100$ %).

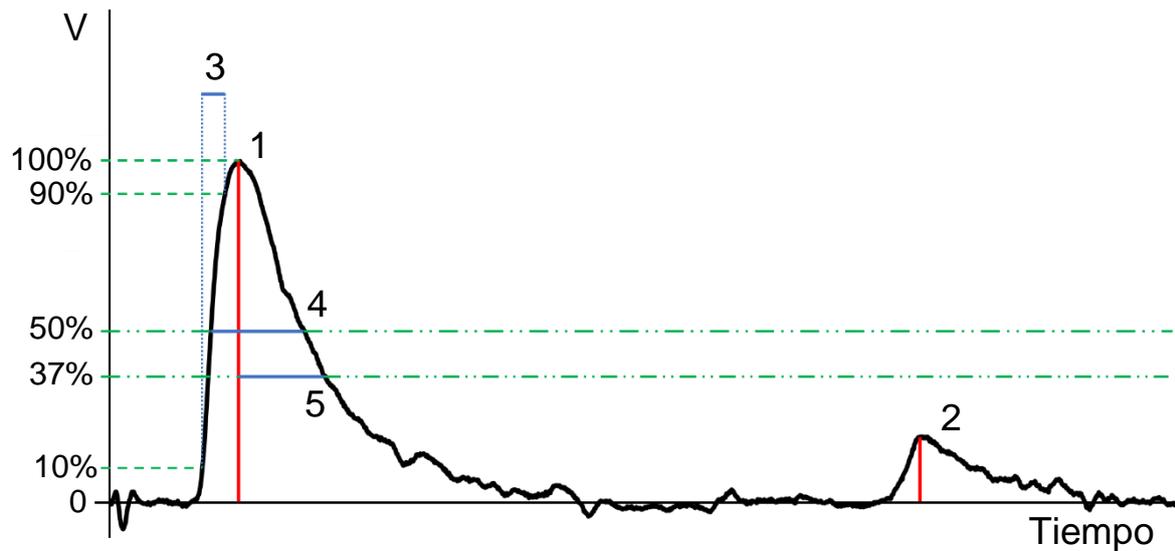


Figura 23. Medida de parámetros electrofisiológicos. El registro muestra un EPP (izquierda) y un mEPP (derecha). Nótese que a fines de la ilustración se ha normalizado el eje de ordenadas al pico del EPP. Las amplitudes del EPP (1) y del mEPP (2) se muestran con sendas líneas rojas. Los parámetros de cinéticos (azul) medidos se muestran en el EPP y fueron el tiempo de subida (3), ancho un-medio (4) y constante de tiempo (τ) (5).

7. Registros de imagen dinámica

Para el estudio de la exo-endocitosis y el potencial de membrana mitocondrial se emplearon preparaciones neuromusculares del TVA procedentes de ratones a P7-10 de la línea Taiwanés-SypHy y Taiwanés, respectivamente.

7.1. Dispositivo experimental

Los registros en tiempo real de la exo-endocitosis y del potencial de membrana mitocondrial se llevaron a cabo en el dispositivo experimental que se muestra en la Figura 24. El dispositivo constaba de los siguientes elementos:

- Microscopio Olympus BX61WI equipado con un módulo confocal de disco giratorio (Fig. 24A, 2-3) (Yokogawa CSU-X1, Intelligent Imaging Innovation)
- Cámara EM-CCD enfriada a -65°C (Fig. 24A, 1) (C9100-13, Hamamatsu)
- Láser de excitación a 488 nm en estado sólido de 50 mW (Fig. 24B, izquierda) (Intelligent Imaging Innovation)
- Filtro de emisión 525/50 nm para la captación de luz verde
- Termistor en línea SF-28 Sloflo (Fig. 24A, 4) y controlador de temperatura TC-344B (Fig. 24B, derecha) (Warner Instruments)
- Electrodo de succión para la estimulación del nervio
- Estimulador de pulsos aislados (modelo 2100, A-M Systems)
- Mesa antivibratoria (Newport)
- Cámara de registro para la preparación neuromuscular
- Sistema de intercambio de solución
- Sistema de gaseo de soluciones con carbógeno (5% CO_2 , 95% O_2)
- Un ordenador y el programa SlideBook 5 (Intelligent Imaging Innovation) para la monitorización y adquisición de las imágenes

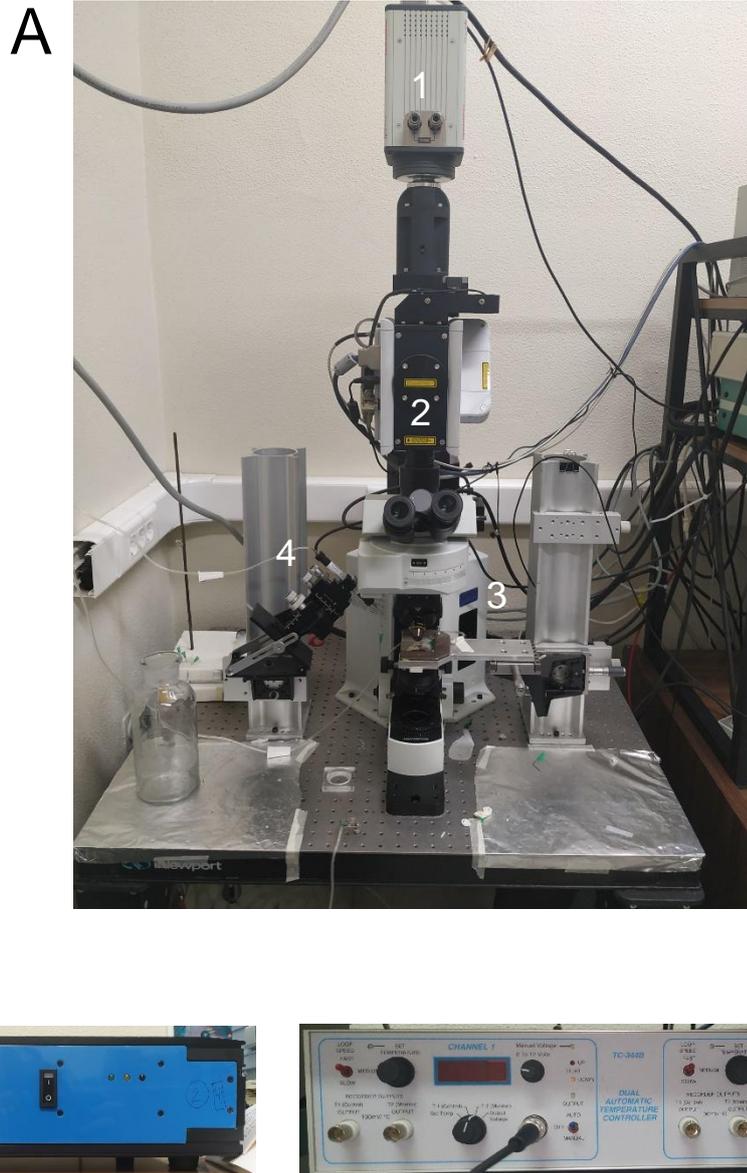


Figura 24. Elementos del dispositivo experimental empleado en los registros de imagen dinámica. A. Visión general del dispositivo experimental que muestra la cámara EM-CCD (1), módulo confocal de disco giratorio (2), Microscopio Olympus BX61WI (3) y el termistor en línea SF-28 Sloflo (4). **B.** Láser de excitación a 488 nm en estado sólido (izquierda) y controlador de temperatura TC-344B (derecha)

7.2. Registro en tiempo real de exo-endocitosis

Una vez extraída la preparación neuromuscular, se transfirió a la cámara de registro y se colocó bajo el microscopio para comprobar su viabilidad. Se consideraba viable si no se observaban contracciones musculares espontáneas y aparecía la contracción evocada tras la aplicación de un pulso eléctrico aislado al nervio a través del electrodo de succión. Así

mismo, se estableció el umbral de estimulación, aplicándose el doble de amplitud para la estimulación en los registros experimentales (generalmente de 2-3 V). A continuación, se aplicó, en flujo continuo y termostatzado a 28-32°C, solución fisiológica estándar con d-tubocuranina 10 μ M (T2379, Sigma-Aldrich) para bloquear la contracción muscular. Tras 15 minutos, se iniciaron los registros de la exo-endocitosis en los terminales motores.

Para la excitación de la fluorina y la adquisición de las imágenes se utilizaron los siguientes parámetros:

- ◆ Potencia del láser: 70%
- ◆ Tiempo de integración: 1000 ms (1 imagen/s)
- ◆ Intensificación digital de la señal: 150
- ◆ Modo de adquisición de fotones: 2

El protocolo de adquisición de imágenes en cada terminal duró, típicamente, 60 segundos. Las primeras 10 imágenes se adquirieron antes de la estimulación del terminal (10 s), las siguientes 10 imágenes durante la estimulación eléctrica con 200 potenciales de acción a 20 Hz (10 s) y las últimas 40 imágenes tras la estimulación eléctrica (40 s). De esta forma se pudieron obtener datos de la fluorescencia basal y de las características del ascenso y descenso de la señal. Entre el registro de un terminal y el siguiente se esperaron al menos 10 minutos para que el terminal se recuperase. Los experimentos nunca duraron más de 3,5 horas desde el sacrificio del animal.

7.3. Registros en tiempo real del potencial de membrana mitocondrial

Para los experimentos de medida del potencial de membrana mitocondrial se utilizó la sonda fluorescente Rodamina-123 (Rhod123; R302, ThermoFisher Scientific). Rhod123 es lipofílica y, por tanto, permeable a través de las membranas biológicas. Sin embargo, esta propiedad también hace que sea insoluble en agua, por lo que tuvo que ser diluida en DMSO. En cualquier caso, la concentración final de DMSO en la solución de la camarita nunca alcanzó el 0,1 % (v/v). Una vez que la sonda atraviesa la membrana plasmática, debido a su naturaleza catiónica, es almacenada en el interior de las mitocondrias dado la gran negatividad del potencial de membrana mitocondrial (~ -139 mV respecto al citosol) (Gerencser *et al.*, 2012). La sonda presenta un máximo de absorción a 507 nm y de

emisión a 529 nm. No obstante, utilizamos el láser de 488 nm para la excitación del fluoróforo.

Tras comprobar la viabilidad de la preparación, se procedió a la carga de la sonda en la solución fisiológica estándar de la cámara de registro a una concentración de 0,3 μM durante 30 minutos y a temperatura ambiente. Durante este tiempo se mantuvo el intercambio de solución interrumpido, pero con burbujeo local de carbógeno. Para realizar los registros se cambió a flujo continuo, termostatzado a 28-32°C, con solución fisiológica estándar conteniendo d-tubocuranina (10 μM) y Rhod123 30 nM.

La estimulación consistió en un tren de 200 o 500 potenciales de acción a 20 Hz. Se registraron 10 segundos previos a la estimulación eléctrica para obtener la línea de base. Entre el registro de un terminal y el siguiente se esperaron al menos 10 minutos para que el terminal se recuperase. Los experimentos nunca duraron más de 2,5 horas desde el sacrificio del animal ni más de 1 hora tras la carga de la sonda.

Para la excitación de la sonda y la adquisición de las imágenes del potencial de membrana mitocondrial se utilizaron los siguientes parámetros:

- ◆ Potencia del láser: 70%
- ◆ Tiempo de integración: 250 ms (4 imágenes/s)
- ◆ Intensificación digital de la señal: 100
- ◆ Modo de adquisición de fotones: 2

Como control, en algunos experimentos, se utilizó 4-AP (0,5 mM), diluido en PBS y aplicado directamente en la cámara de registro, o CCCP (1 μM) diluido en DMSO.

8. Adquisición y Análisis de Imágenes

8.1. Microscopía láser confocal

Las imágenes se adquirieron mediante un microscopio confocal multiespectral motorizado Olympus FV1000 (Fig. 25A). El microscopio confocal utilizado está equipado con 3 líneas láser de excitación: (i) láser multilínea de argón (M_Ar) con excitación a 458, 488 y 515 nm (Fig. 25B), (ii) láser de helio-neón verde (HeNeG) con excitación a 561 nm (Fig. 25D) y (iii) láser de helio-neón rojo (HeNeR) con excitación a 633 nm (Fig. 25C).



Figura 25. Componentes del microscopio láser confocal Olympus FV1000. A. Microscopio motorizado de transmisión directa Olympus FV1000. **B.** Sistema láser de Argón. **C.** Sistema láser de Helio-Neón rojo. **D.** Sistema láser de Helio-Neón verde (1) y sistema de ventilación de los láseres (2).

La adquisición se realizó de forma secuencial para los diferentes láseres, para evitar la excitación cruzada de las muestras marcadas con diferentes fluoróforos. Las imágenes se adquirieron como secciones ópticas seriadas en el eje Z (Z-stacks) e imágenes de un solo plano utilizando un objetivo de inmersión en aceite 60x tipo PlanApo N (PLAPON60xO, Olympus) con una apertura numérica (NA) de 1,42. Se empleó el programa FV10-ASW 1.7 Viewer (Olympus), diseñado mediante un sistema de ventanas compuesto por dos partes principales:

1. Menú de control con un sistema de pestañas con las distintas opciones de captura (Fig. 26).
2. Visualización de imágenes.

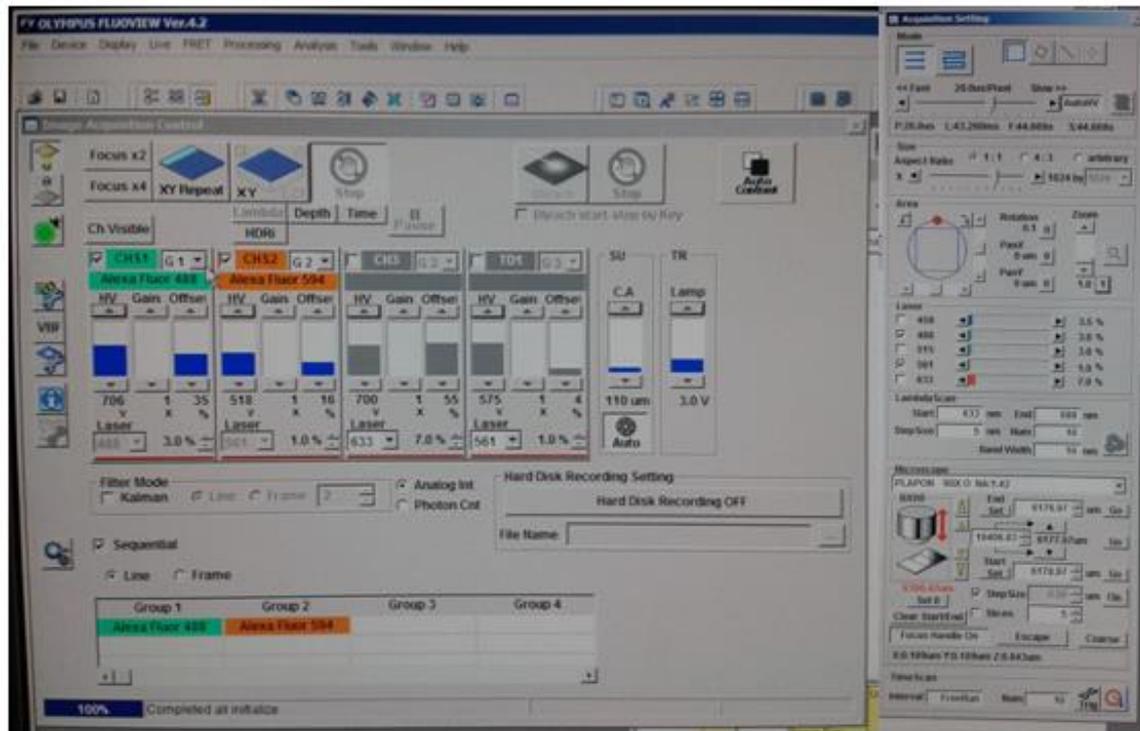


Figura 26. Ejemplo de parámetros de captura utilizados para la adquisición de imágenes mediante el programa FV10-ASW.

Las imágenes obtenidas para detectar una proteína concreta fueron adquiridas con los mismos parámetros para los distintos genotipos. En la Tabla VII se muestra los valores de intensidad usados en los distintos experimentos en función de la proteína estudiada. El voltaje del fotomultiplicador (HV; ganancia) se mantuvo constante entre hermanos de camada y genotipos. Solo el *offset* fue modificando en función de la saturación de las imágenes adquiridas, intentando mantener el parámetro entre hermanos de camadas y siempre en el intervalo 13-30%. En la Tabla VIII vienen indicados otros parámetros de adquisición de imágenes en función del experimento realizado.

Tabla VII. Parámetros de excitación láser en función de la proteína estudiada.

Proteína de interés	Láser	Intensidad
SMN	594	2 %
	647	2 %
NF-M	488	0,5 %
MAP1B	488	0,5 %
	647	0,5 %
AChR	594	0,7 %
HuD	488	4 %
vGLUT2	647	5 %
ChAT	488	4 %
	647	4 %

Tabla VIII. Parámetros de adquisición de imágenes en función del experimento.

Preparación	Experimento	Desplazamiento en eje Z (μm)	Apertura Confocal (μm)	Tamaño del pixel (μm)
Neuromuscular	Análisis de expresión de proteínas en axones y en la NMJ	0,5	115 ó 200	0,034
	Estudio de transcritos	0,5	115	0,034
Médula Lumbar	Análisis de los contactos sinápticos	0,4	300	0,05
	Análisis de expresión de proteínas en soma de motoneuronas	0,4	115	0,132

8.2. Microscopía láser de superresolución

Las imágenes de superresolución se adquirieron utilizando un sistema STEDYCON (Abberior Instruments; Fig. 27A), cortesía de la empresa Izasa, acoplado a nuestro sistema confocal o a un microscopio Nikon. Este sistema emplea la técnica de depleción de emisión estimulada (STED, *STimulated Emission Depletion*), la cual mejora la resolución óptica del sistema mediante minimización del área de iluminación en el punto focal gracias la desactivación selectiva de la fluorescencia con un láser de depleción (Fig. 27B y C). En nuestro sistema, el láser empleado para la depleción fue de 775 nm.

Se adquirieron secciones ópticas seriadas en el eje Z (Z-stacks) e imágenes de un solo plano utilizando un objetivo de inmersión en aceite 60x tipo PlanApo N (PLAPON60xO, Olympus) con una apertura numérica (NA) de 1,42.

Las imágenes fueron deconvolucionadas con el programa Huygens Essentials® y procesadas y analizadas usando el software ImageJ (W. Rasband, National Institutes of health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Se sustrajo la señal de fondo y se aplicó un suavizado antes de los análisis. El análisis del tamaño de los gránulos SMN se realizó mediante la medición de ancho un medio (FWHM) con el complemento de ImageJ "Adrian's FWHM" y la estimación del área suponiendo que los gránulos son círculos perfectos. Para el análisis de la señal de SMN, la intensidad media, la intensidad máxima y la densidad integrada se midieron en regiones de interés (ROI) potencialmente equivalentes a gránulos individuales. El número de gránulos SMN se estimó mediante la rutina "analizar partículas". La densidad de los gránulos se estimó en planos individuales que se normalizaron al área NF-M correspondiente. Para detectar diferencias estadísticas, se aplicó un *t*-test y solo se consideraron significativas aquellas con valores $p < 0.05$.

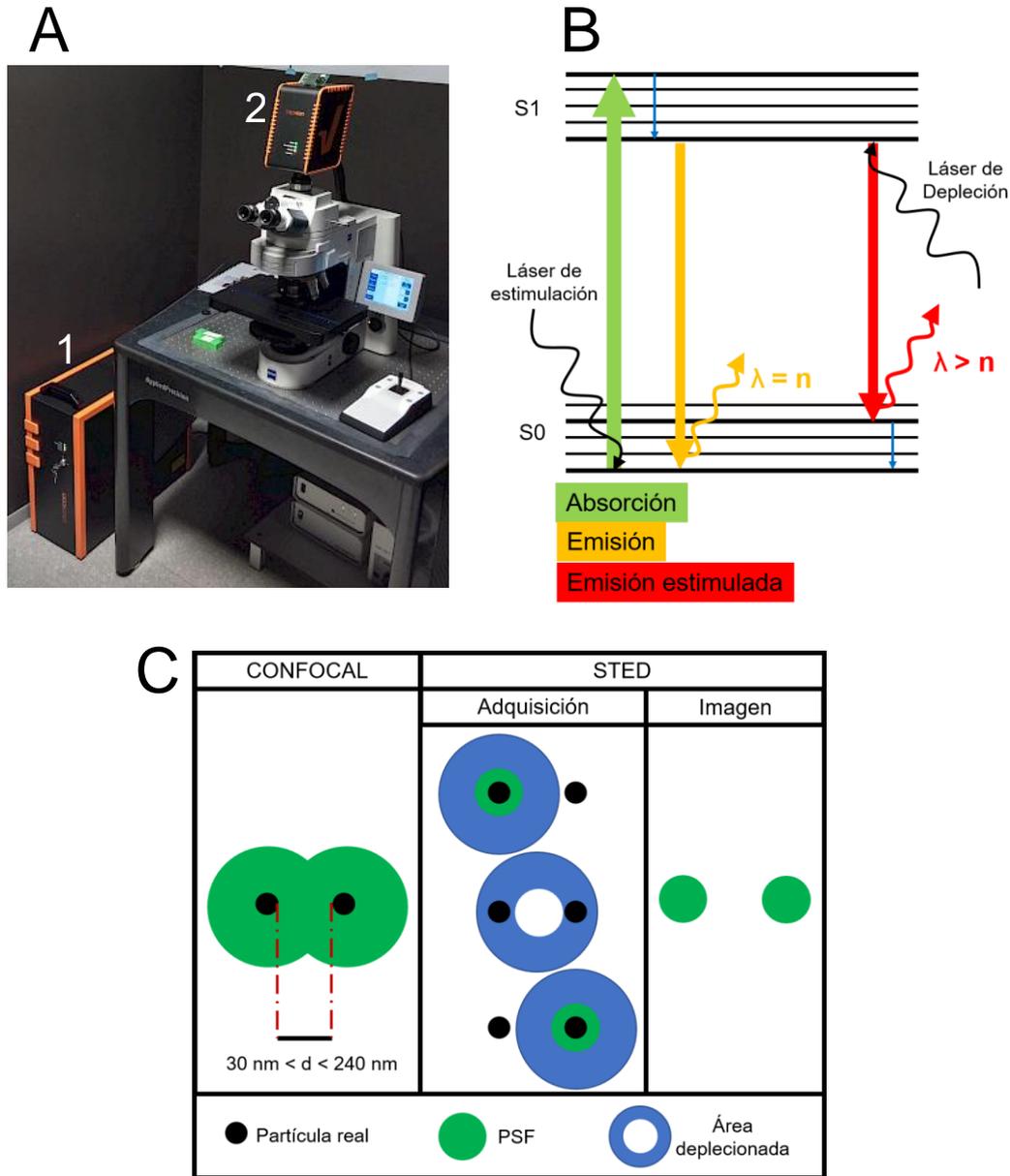


Figura 27. Sistema STEDYCON y principios de la técnica STED. **A.** El dispositivo consta de sistema de control de los láseres (1) y un sistema de estimulación y de detección (2). Imagen tomada de <https://www.abberior-instruments.com/products/compact-line/stedycon/>. **B.** Diagrama de Jablonski y el fenómeno de depleción estimulada. La fluorescencia se produce por una serie de transiciones en el estado electrónico de una molécula. En primer lugar, la energía aportada por un fotón (excitación) es absorbida por un electrón del fluoróforo que pasa del estado fundamental (S0) a un estado electrónico de mayor energía (S1) (flecha verde). A continuación, el electrón pierde energía dentro del mismo spin (relajación vibracional sin radiación, flecha azul) y vuelve a S0 (flecha ocre) emitiendo un fotón (fluorescencia). El láser de depleción hace que el electrón excitado vuelva a un estado vibracional más alto en el spin fundamental por lo que libera un fotón de mayor longitud de onda (λ) que será filtrado. **C.** Comparación de la microscopía confocal y STED. El STED depleciona la fluorescencia alrededor de un punto focal central de emisión de fluorescencia, lo que permite disminuir el tamaño de la función de dispersión de puntos (PSF) e incrementar la resolución.

8.3. Análisis de imágenes

El análisis de los somas, axones y terminales motores se llevó a cabo con el programa ImageJ. Las imágenes presentadas en este trabajo son una proyección máxima en el eje Z de las secciones individuales obtenidas en cada serie, a menos que se especifique lo contrario. El único tratamiento de las imágenes fue un suavizado, consistente en un filtro que difumina la imagen o selección activa reemplazado cada píxel por el promedio de su vecindario 3×3 .

1. Área del soma de las motoneuronas. En primer lugar, se delimitó el ROI con la proyección máxima de las imágenes correspondientes al marcaje del anticuerpo anti-acetilcolin-transferasa (ChAT). A continuación, la imagen se convirtió de 16 bits (RGB) a 8 bits (escala de grises) y se estableció un umbral de forma semiautomática. Finalmente se delimitó el perfil de superficie generado por el umbral y se midió el área englobada por este perfil.

2. Cuantificación de la fluorescencia de las proteínas de interés en el soma de las células del asta ventral espinal. En primer lugar, se delimitó el ROI con el marcaje del anticuerpo anti-ChAT. Para ello, las imágenes de los 3 planos centrales de la célula, identificados por el núcleo, se convirtieron de 16 bits (RGB) a 8 bits (escala de grises) y se estableció un umbral de forma semiautomática, se delimitaron los perfiles de superficie generados y se midió el área englobada por cada uno de estos perfiles. Posteriormente, en el canal de la proteína de interés se seleccionaron los mismos planos y se convirtieron a 8 bits. Finalmente, se estableció un umbral de forma manual (manteniéndose constante entre células y ratones) y se midieron el área y la intensidad de las señales contenidas en los ROI.

3. Cuantificación del número de contactos sinápticos excitatorios en las motoneuronas espinales. En primer lugar, se identificaron las motoneuronas por su ubicación en el asta ventral y su inmunoreactividad al anticuerpo anti-ChAT. Así mismo, las imágenes se convirtieron de 16 bits (RGB) a 8 bits (escala de grises), se estableció un umbral de forma semiautomática y se delimitaron los perfiles de superficie generados. A continuación, se realizó la proyección máxima del canal para vGLUT2 y se contaron de

forma manual los contactos sinápticos, identificados por su inmunoreactividad y por localizarse en íntima aposición con el perfil de ChAT. Para evitar una infraestimación de los contactos, se comprobaron los contactos contabilizados en cada plano de la célula.

4. Área postsináptica. Se delimitó el ROI con la proyección máxima de las imágenes correspondientes al marcaje con BTX-Rho. A continuación, la imagen se convirtió a 8 bits y se estableció un umbral de forma semiautomática. Finalmente se midió el área total de los píxeles por encima del umbral y se delimitó el perfil de esta área para los estudios del resto de proteínas.

5. Área de las proteínas de interés en la NMJ. Para el análisis de la expresión de SMN en los terminales de los ratones silvestres se delimitó el perfil del área postsináptica mediante la proyección máxima del canal para la BTX. Este perfil se trasladó a las proyecciones máximas de los canales para SMN y NF, y se aplicó un “umbral” común para las distintas muestras, obteniéndose las intensidades medias y áreas.

6. Análisis de granos. Para el análisis del tamaño de los gránulos de SMN en los axones se aplicó la opción “perfil del trazo” en el eje mayor del gránulo, obteniéndose la distribución de intensidad en ese eje. Finalmente se midieron las longitudes de los anchos medios de estas distribuciones. Para medir las interdistancias entre granos se realizó un suavizado de las imágenes y se aplicó la opción “perfil del trazo” a través de los centros de los granos y se midió la distancia entre picos de intensidad.

Para determinar la colocalización entre SMN, NF y MAP1B en los axones y terminales motores se aplicó la opción “perfil del trazo” en el eje transversal de los axones o de las ramas citoesqueléticas intraterminales, atravesando el punto medio de algún grano.

9. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa informático GraphPad Prism 5. Para todas las variables se siguió diagrama de flujo expuesto en la Figura 28.

9.1. Estudio de la normalidad y de la homogeneidad de varianzas

Se emplearon dos tests de normalidad según el tamaño muestral (n) de la variable:

1. Test de Shapiro-Wilk: se empleó en aquellos casos en los que $n \leq 50$
2. Test de Kolmogorov-Smirnov: se empleó en aquellos casos en los que $n > 50$

La obtención de un valor de significación (p) mayor a 0,05 permitió la aceptación de la hipótesis de normalidad. En caso contrario, se rechazó la hipótesis de normalidad. En los casos en los que los datos seguían una distribución normal, se empleó el test de Levene para estudiar la homocedasticidad u homogeneidad de las varianzas, situación que se aceptó cuando test arrojase una $p > 0,05$.

9.2. Estudio de las diferencias entre grupos experimentales para variables cuantitativas

En los experimentos en los que había dos grupos experimentales, las diferencias estadísticas entre variables se evaluaron mediante la prueba *t de Student* siempre que se pudiese aceptar la hipótesis de normalidad, asumiendo varianzas iguales o desiguales en función del test de Levene. En los casos en los que se rechazase la hipótesis de normalidad, la evaluación de las diferencias estadísticas se realizó mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

En los experimentos en los que había más de dos grupos experimentales las diferencias estadísticas se evaluaron mediante uno de los siguientes test:

1. ANOVA: Se empleó cuando las variables estudiadas seguían una distribución normal y presentaban homogeneidad de varianzas. Valores de $p < 0,05$ implica la existencia de diferencias significativas entre los grupos experimentales, es decir, la existencia de al menos dos poblaciones distintas de datos en función de la

variable estudiada. Para identificar entre qué grupos existían las diferencias, se empleó posteriormente un test de comparaciones múltiples: test de Bonferroni o de Tamhane si presentaban homogeneidad de varianzas o no, respectivamente.

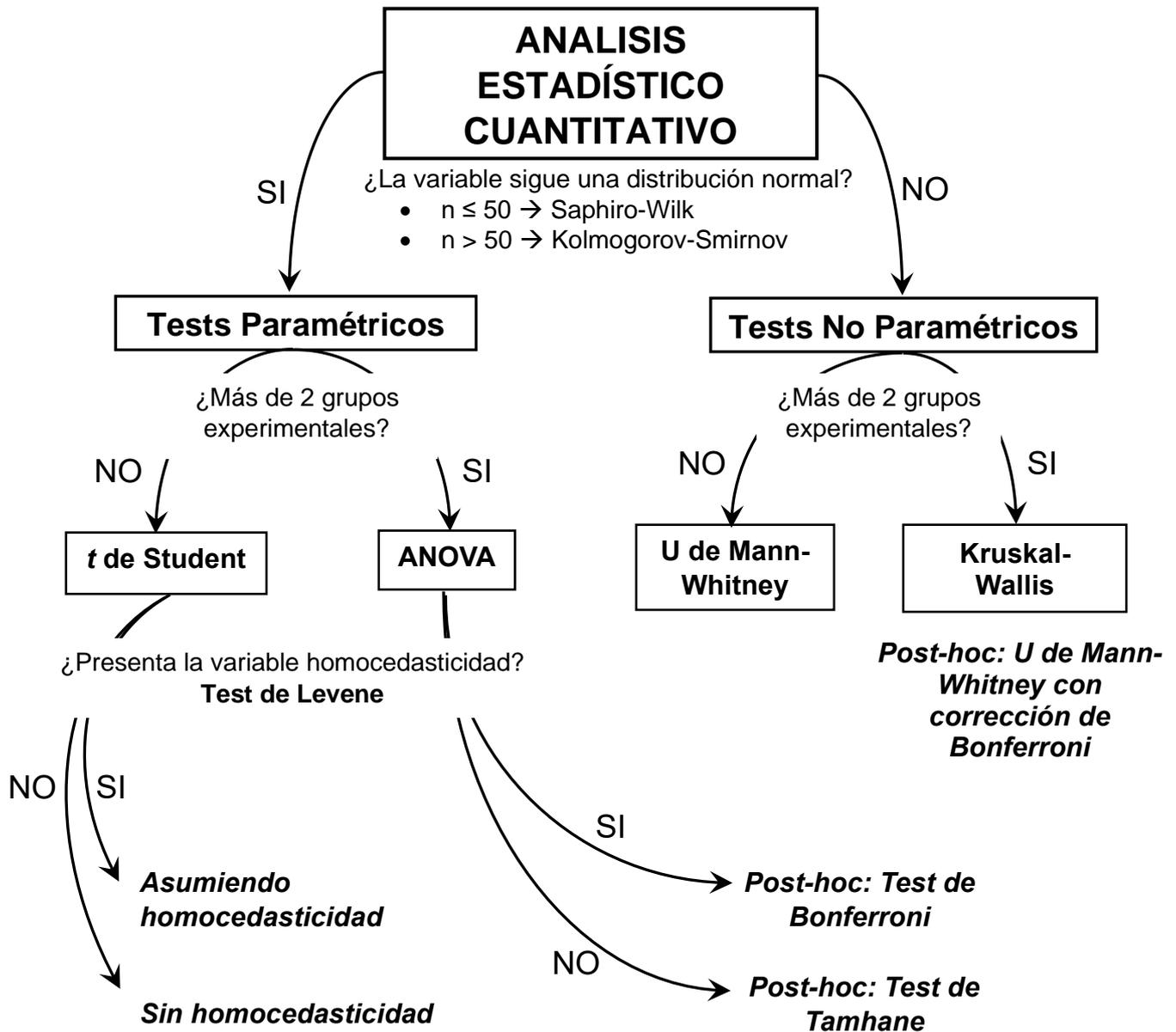


Figura 28. Diagrama de flujo de los análisis estadísticos realizados.

2. Test de Kruskal-Wallis: Se empleó cuando las variables estudiadas no seguían una distribución normal, siendo el test no paramétrico equivalente al ANOVA. Para identificar entre qué grupos existían las diferencias, se empleó posteriormente un test no paramétrico U de Mann-Whitney aplicándole la llamada corrección de Bonferroni. Esta corrección se basa en la consideración de significación estadística en aquellos casos en los que se cumpla que:

$$p < \frac{2\alpha * (N - 2)!}{N!}$$

Siendo p el valor de significación estadística, α el error de tipo I asumido (0,05 en el presente trabajo) y N el número de grupos experimentales analizados.

Todos los datos presentes en esta tesis vienen representados, salvo que se indique expresamente lo contrario, como la media \pm error estándar de la media, siendo n el número de eventos analizados y N el número de experimentos realizados. Excepto en caso de aplicación de la corrección de Bonferroni, la significación estadística siguió el siguiente patrón: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

Resultados

A continuación, se exponen los *Resultados* obtenidos divididos en tres grandes apartados de acuerdo con los objetivos generales y específicos planteados. En el primero se muestran la organización de SMN en los axones y terminales presinápticos motores, la colocalización de SMN con el citoesqueleto y la posible relación de SMN con elementos de la maquinaria de traducción local durante la maduración postnatal del terminal nervioso. En el segundo, la afectación tanto de la exocitosis como de la endocitosis en los terminales motores del modelo Taiwanés de AME y la posible implicación de la mitocondria en el déficit funcional del terminal. En el tercero, el aumento de la neurotransmisión en ratones controles y SMN-deficientes de un modificador de los canales de calcio dependientes de potencial.

1. Análisis de las características de la expresión de SMN en axones y terminales motores de ratones silvestres y modelos de AME. Posible relación de SMN con el citoesqueleto y la maquinaria de traducción local

1.1. Expresión de la proteína Smn endógena y SMN heteróloga en axones y terminales motores

1.1.1. Características y validación del anticuerpo empleado

Para detectar la presencia de la proteína de supervivencia neuronal murina (Smn) y humana (SMN) en ratones silvestres y en modelos de AME se empleó el anticuerpo anti-SMN H-195 (Santa Cruz Biotechnology). H-195 es un anticuerpo policlonal de conejo generado por exposición a un péptido recombinante con los aminoácidos 1-195 de la proteína SMN humana. Este anticuerpo ha sido ampliamente utilizado para identificar la proteína SMN en células SH-SY5Y y en cultivos primarios de neuronas centrales (Peter *et al.*, 2011) así como en cultivos de motoneuronas (Zhang *et al.*, 2006; Akten *et al.*, 2011; Peter *et al.*, 2011; Tapia *et al.*, 2012). Así mismo, se ha empleado para identificar SMN en cortes de médula espinal de ratas y humanos (Rafałowska *et al.*, 2012, 2014) y en músculo esquelético (Berciano *et al.*, 2020).

En nuestro laboratorio, la validación del anticuerpo se realizó por inmunotransferencia en tejido de médula espinal y por inmunocitoquímica en motoneuronas en cultivo espinal.

El estudio de sensibilidad del anticuerpo H195 se realizó mediante inmunotransferencia de muestras de medula espinal de ratones controles del modelo SMA Δ 7, que expresan tanto la proteína murina Snn como las proteínas heterólogas SMN y SMN Δ 7. Tras la electroforesis, se obtuvieron dos bandas, una más intensa a 38 kD, correspondiente a las proteína Snn/SMN, y otra de menor intensidad a 26 kD (Fig. 29A), correspondiente a la proteína truncada (Le *et al.*, 2005). La intensidad de las bandas, además, correlacionó con las concentraciones de proteínas empleadas en el experimento. Estos resultados muestran que nuestro anticuerpo es sensible tanto a la proteína SMN como a la forma truncada SMN Δ 7 producto de los transgenes *SMN2* y *SMN Δ 7*, respectivamente.

La especificidad del anticuerpo se testó mediante inmunofluorescencia en motoneuronas de ratones silvestres en cultivo primario (Fig. 29B), cortesía del Dr. Saravanan Arumugan, en los que se indujo la inhibición de la expresión de Snn mediante infección lentiviral (Arumugam *et al.*, 2017). En las motoneuronas infectadas con el vector vacío (EV-Snn) la señal del anticuerpo se localizó en soma y neuritas, en el cono de crecimiento y en el núcleo, en este último caso, compatible con su presencia en las *gems* (Fig. 29B, paneles inferiores). En motoneuronas infectadas por virus cargados con ARN silenciador de Snn (sh-Snn), en cambio, la señal de Snn se redujo drásticamente en soma, neuritas, conos de crecimiento y núcleo (Fig. 29B, panel derecho). Estos datos indican que la señal obtenida con este anticuerpo correlaciona directamente con los niveles de proteína Snn.

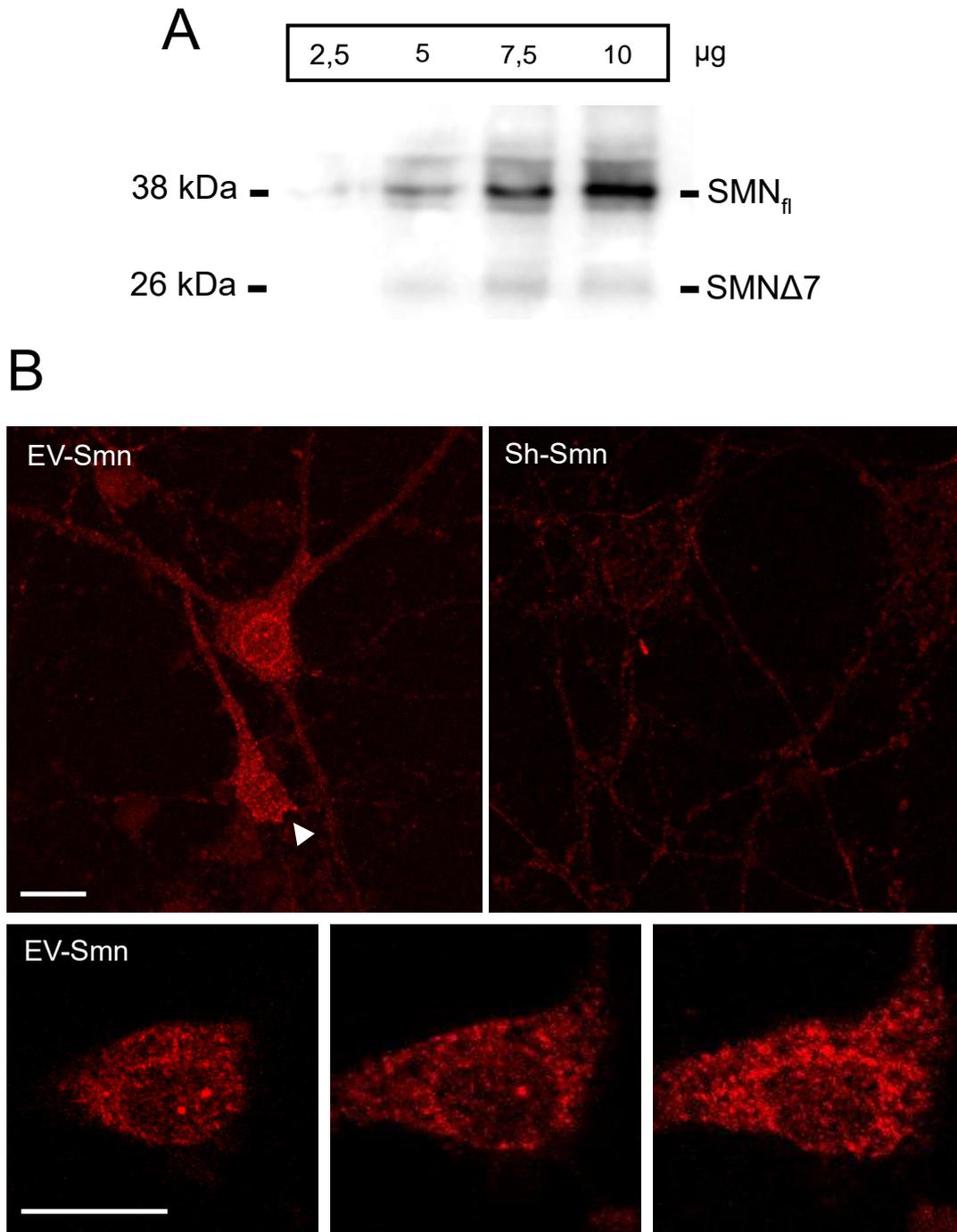


Figura 29. Validación del anticuerpo policlonal de conejo anti-SMN H-195. A. Inmunotransferencia de muestras de medula espinal toraco-lumbar procedentes de ratones control a P9 del modelo SMNΔ7 a distintas concentraciones de proteína. Nótese la presencia de dos bandas: una a 38 kDa y otra a 26 kDa, correspondientes a las formas completa (SMN_{fl}) y truncada (SMNΔ7). **B.** Imágenes de motoneuronas espinales de ratones silvestres tras 11 días en cultivo (DIV11). Paneles superiores: las motoneuronas infectadas con un vector vacío (EV) presentan señal anti-SMN en soma, neuritas y cono de crecimiento (punta de flecha). Sin embargo, las motoneuronas infectadas con Sh-Smn no aparecen marcadas. Los paneles inferiores muestran en detalle la señal de SMN en el soma y en el interior del núcleo (*gems*) en distintos planos de una misma motoneurona. Barras de escala: 20 µm.

1.1.2. Presencia de Smn en axones y terminales motores de ratones silvestres

A continuación, comprobamos la presencia de señal anti-Smn en axones y terminales motores *ex vivo* mediante inmunohistoquímica de preparaciones neuromusculares del músculo TVA de animales silvestres a P3. La señal de Smn obtenida fue intensa, distribuyéndose en haces y acúmulos, estos últimos a nivel de la NMJ, como lo muestra su distribución en el área marcada con el marcador postsináptico BTX-rodamina (Fig. 30, recuadro y paneles inferiores). Además, se observó marcaje difuso fuera del componente neural, compatible con la presencia de Smn en fibras musculares (Walker *et al.*, 2008; Berciano *et al.*, 2020).

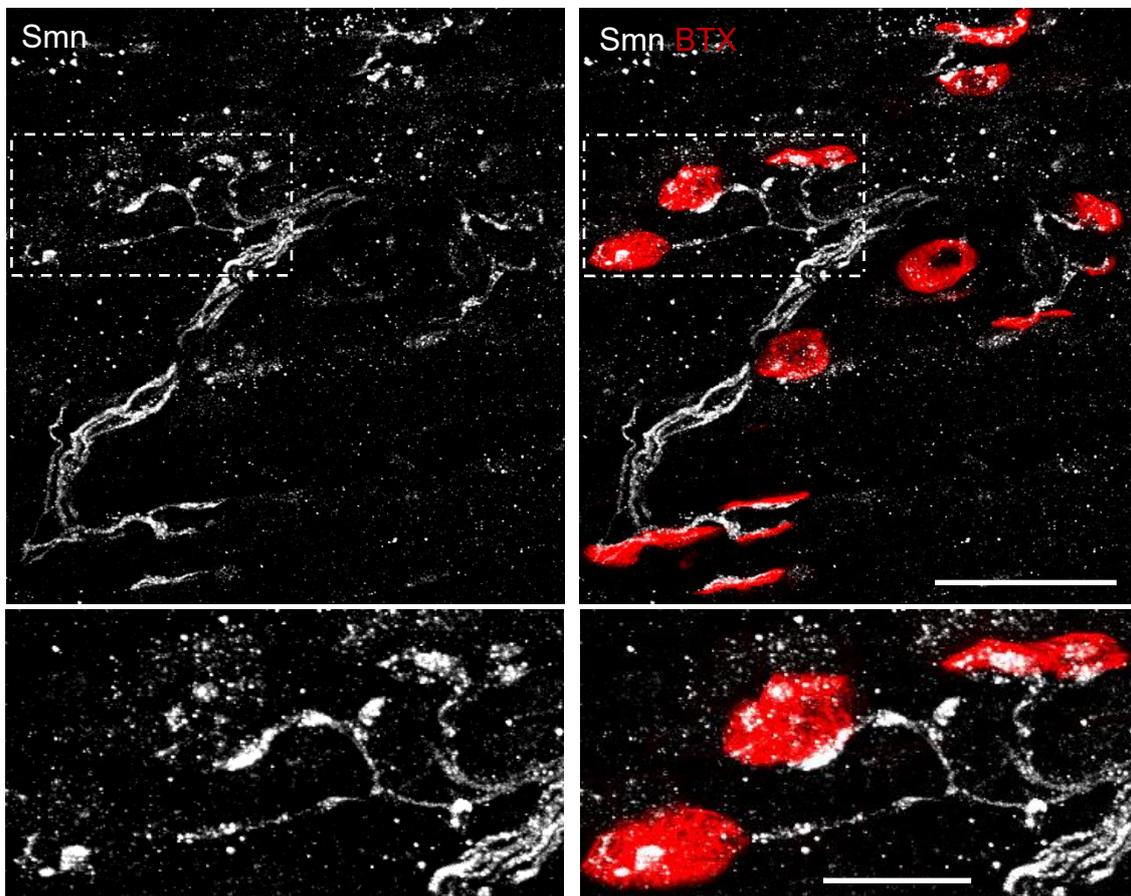


Figura 30. Presencia de Smn en axones motores y uniones neuromusculares en ratones silvestres. Proyección de intensidad máxima en una preparación neuromuscular representativa del músculo TVA a P3. La inmunofluorescencia de Smn (blanca) se detecta en axones motores y terminales nerviosos. Los paneles inferiores son ampliaciones de los recuadros superiores. Obsérvese la aposición de Smn con el marcador postsináptico Rodamina-BTX (rojo). Barras de escala: 50 μm y 20 μm (recuadro).

1.1.3. Smn presenta un aspecto granular en axones y terminales presinápticos

Para estudiar las características de la señal y el patrón subcelular de distribución de Smn en axones y terminales motores se tomaron imágenes con mayor resolución en preparaciones neuromusculares de TVA de ratones silvestres, observándose un patrón granular en ambas localizaciones (Fig. 31).

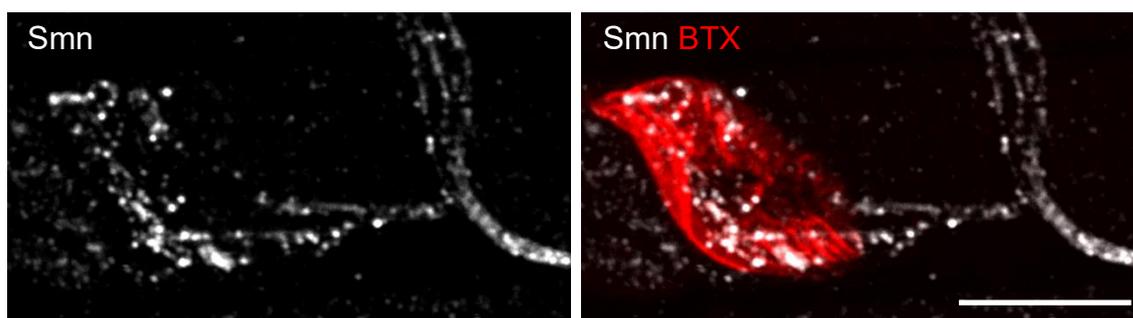


Figura 31. Smn presenta un aspecto granular en el terminal presináptico y en los axones. Proyección de máxima intensidad que muestra una unión neuromuscular del músculo TVA procedente de un ratón silvestre a P3. La inmunofluorescencia de Smn (blanca) presenta un patrón granular tanto en el axón distal como en la unión neuromuscular, identificada mediante marcaje del aparato postsináptico con BTX (rojo). Barra de escala: 10 μm .

En los axones más delgados, los granos se encontraron dispuestos en fila india (Fig. 32A), con una distancia media (centro-centro) de $1,95 \pm 0,12 \mu\text{m}$ ($n = 114$ granos, 9 axones, $N = 3$ ratones), siendo las interdistancias menores a $2,4 \mu\text{m}$ las más frecuentes (72%) (Fig. 32B y C). En estos axones, la densidad media de granos de SMN fue de $0,55 \pm 0,03 /\mu\text{m}$ ($n = 123$ granos, 9 axones, $N = 3$ ratones).

El análisis del diámetro de los granos en los axones se realizó mediante perfiles de intensidad y cálculo de las anchuras al 50% de la intensidad máxima (ancho un-medio). El estudio reveló una población homogénea de granos en función del tamaño, siendo el diámetro medio de $352,2 \pm 4,3 \text{ nm}$ ($n = 75$ granos, 15 axones, $N = 3$) en las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal convencional (Fig. 32D y E).

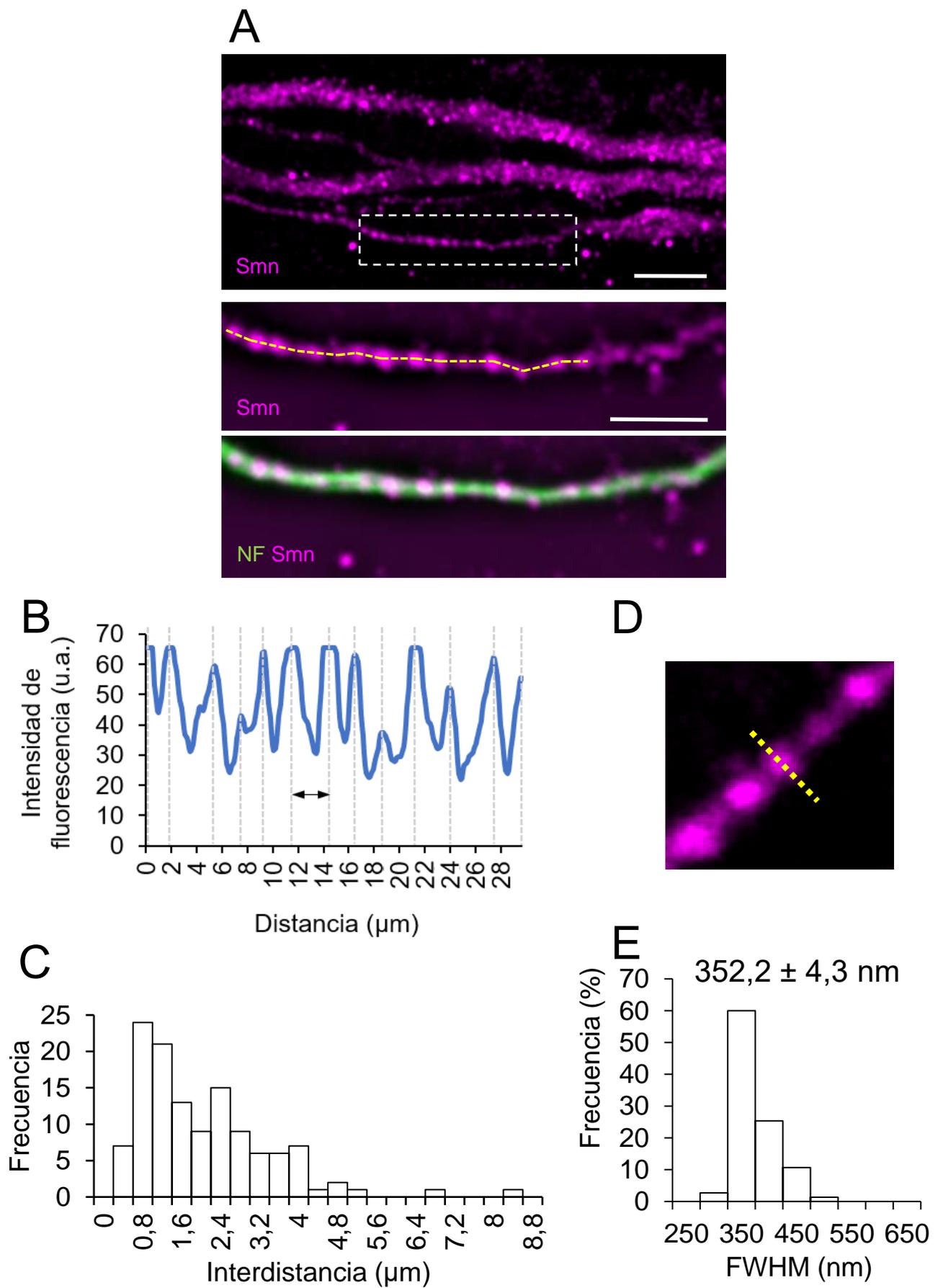


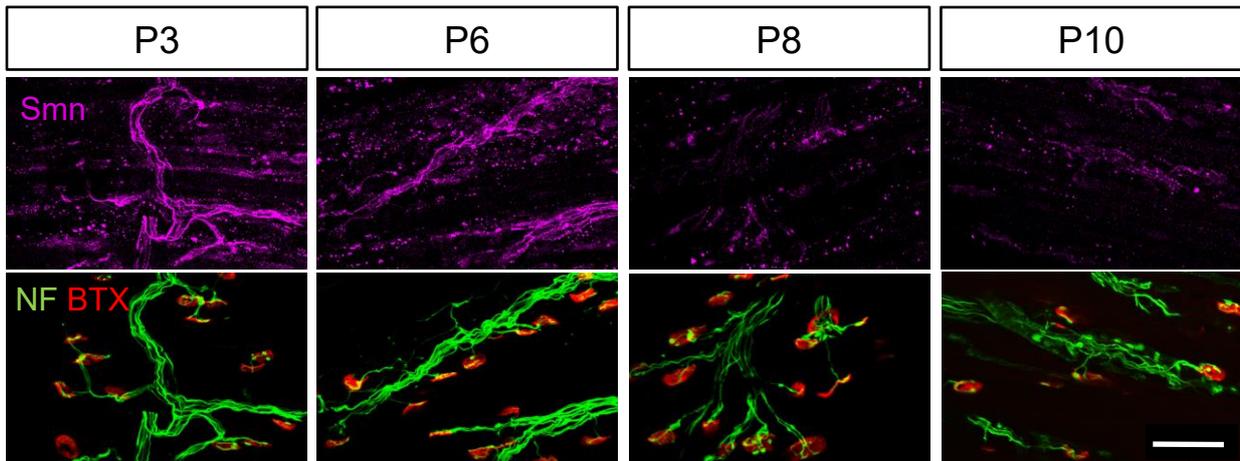
Figura 32 (página anterior). Características de los granos axonales de Snn. A. Proyección de intensidad máxima de la preparación neuromuscular del músculo TVA de un ratón silvestre a P3. La inmunofluorescencia de Snn (magenta) presenta un patrón granular, especialmente claro en los axones más finos (recuadro y paneles inferiores). Nótese en los paneles inferiores la disposición en fila india de los granos de Snn en los axones, identificados mediante marcaje anti-NF (verde). Barras de escala: 5 μm (panel superior) y 3 μm (paneles inferiores). **B.** Ejemplo de perfil de intensidad, correspondiente a la línea punteada en el panel central de A. Las líneas verticales grises indican el centro de cada grano. **C.** Histograma de frecuencia de las interdistancias entre los granos axonales. **D.** Ejemplo de análisis de perfil de intensidad en un grano para el estudio de su diámetro aparente. **E.** Histograma de frecuencia del diámetro de los granos y valor medio.

1.1.4. La señal de Snn en los terminales nerviosos de ratones silvestres disminuye con la edad

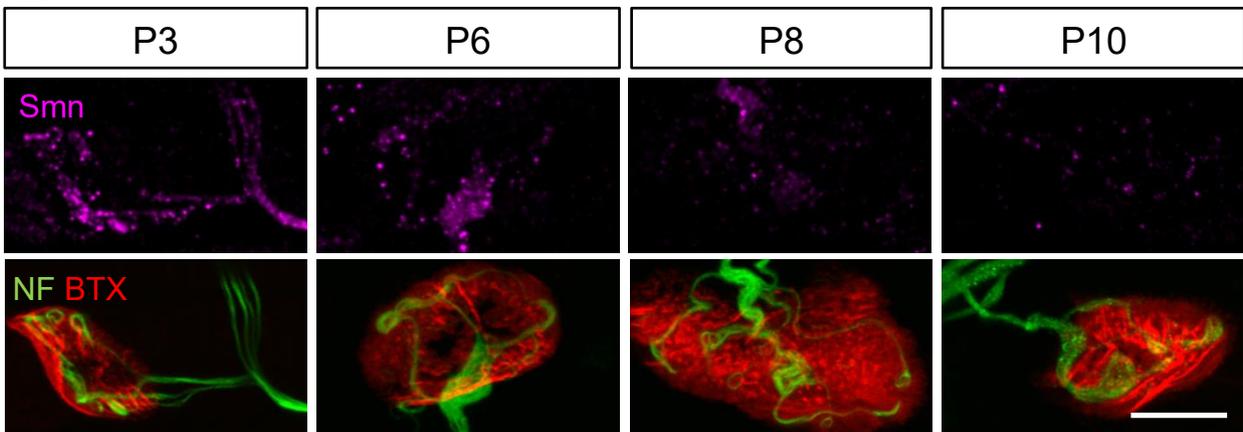
Aunque SMN es una proteína ubicua esencial para funciones celulares básicas, diversos estudios han mostrado que sus niveles descienden en la mayoría de los tejidos tras el periodo de desarrollo y la maduración postnatal, manteniéndose relativamente elevados, no obstante, en el soma de las motoneuronas (Groen *et al.*, 2018). En el presente trabajo hemos investigado si se produce o no un descenso fisiológico de la proteína en los axones y terminales motores durante el periodo de maduración postnatal. Para ello, realizamos marcajes inmunohistoquímicos de preparaciones neuromusculares de TVA procedentes de animales silvestres a distintas edades: P3, P6, P8, P10 y P60.

Durante la primera semana postnatal, la señal de Snn obtenida fue intensa tanto en los axones como en los terminales motores, como muestra los ejemplos de la Figura 33A y B. Sin embargo, la señal se redujo significativamente durante la segunda semana de vida ($p < 0,0001$, test de Kruskal-Wallis). La evolución temporal del área de la señal anti-Snn se representa en la Figura 33D. El área de marcaje de Snn en el terminal fue estable durante la primera semana, representando un $7,37 \pm 0,61$ % del área postsináptica a P3 (38 terminales, 3 ratones) y un $7,18 \pm 3,52$ % a P6 (28 terminales, 2 ratones). Sin embargo, durante la segunda semana postnatal se produjo una reducción significativa de la señal, representando un $3,34 \pm 0,28$ y $1,17 \pm 0,1$ % del área postsináptica a P8 (24 terminales, 2 ratones) y P10 (22 terminales, 2 ratones), respectivamente ($p < 0,005$ y $< 0,0005$, post-hoc: test de Bonferroni respecto a P3). Durante la edad adulta, la señal de Snn no fue detectable con la misma intensidad laser y parámetros de adquisición utilizados a edades perinatales (Fig. 33C). Sin embargo, aún pudieron detectarse vestigios de señal en el terminal a mayores intensidades de estimulación láser.

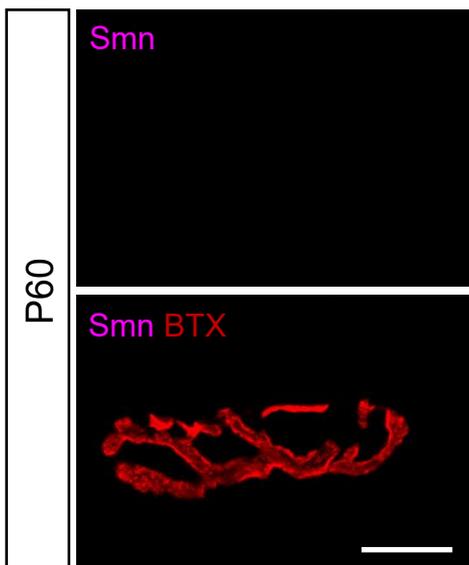
A



B



C



D

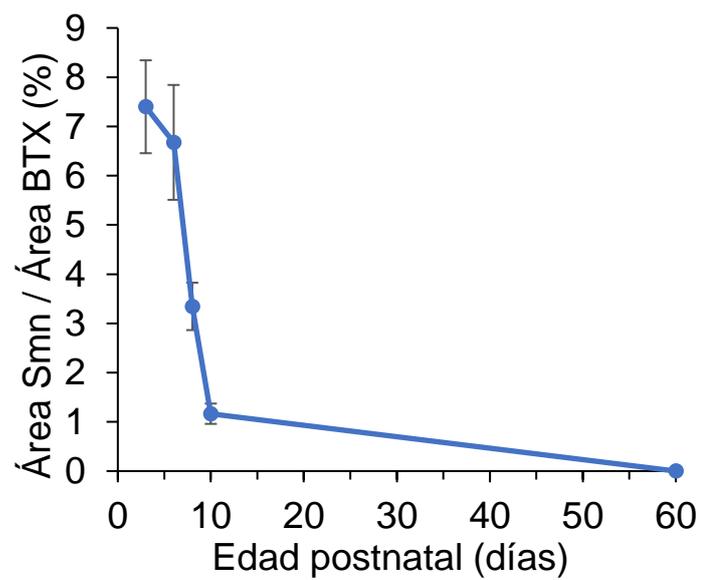


Figura 33 (página anterior). Smn disminuye progresivamente en los axones y terminales nerviosos motores de los ratones silvestres durante las dos primeras semanas de vida. Proyecciones de máxima intensidad de axones y terminales motores de músculos TVA procedente de ratones silvestres a distintas edades. Las uniones neuromusculares fueron identificadas mediante marcaje para NF-M y BTX (verde y rojo, respectivamente). **A.** Imágenes a bajo aumento de una región del músculo. La señal de Smn (magenta) es intensa a P3 y a P6 (paneles izquierdos), pero débil a P8 y P10 (paneles derechos). **B.** Detalle de la expresión de Smn en los terminales motores a distintas edades. Nótese la escasa señal a P8 y P10. **C.** Señal de Smn en la edad adulta. **D.** Evolución con la edad del área de Smn normalizada al área postsináptica. Barras de escala: 50 (A) y 10 (B y C) μm .

Estos datos indican que los axones y terminales motores presentan altos niveles de Smn solo durante las primeras etapas de la maduración postnatal, siendo muchos menores durante la edad adulta.

1.1.5. Impacto de la sobreexpresión de SMN en axones y terminales presinápticos motores

Los resultados obtenidos en el modelo silvestre fueron contrastados en el modelo murino de AME SMA Δ 7. Estos ratones poseen en cada alelo dos copias del transgén humano *SMN2* y dos copias del transgén *SMN Δ 7*, junto con una copia (controles) o ninguna (mutantes) del gen murino *Smn*. Podemos, por tanto, presuponer que la expresión de los dos transgenes dará lugar mayoritariamente a proteína truncada. Este hecho planteó dos cuestiones: i) ¿sigue la expresión de la proteína SMN heteróloga en los axones y terminales motores el mismo curso temporal que la expresión de la proteína endógena Smn? ii) ¿forma la proteína SMN completa y truncada granos de características morfológicas y distribución similares a los formados por proteína Smn?

Para responder a estas cuestiones realizamos inmunomarcaje en iguales condiciones experimentales y con los mismos parámetros de adquisición que en los ratones silvestres. Para abordar la primera pregunta estudiamos la expresión en los ratones modelo de AME a P9 y P10, una edad a la que la señal en los ratones silvestre había disminuido ya un 87% (Fig. 33D). En estos experimentos, además del TVA, también se estudió otro músculo que presenta un grado afectación menor en los modelos de AME, el LAL.

Sorprendentemente, tanto en controles como en mutantes se observó señal intensa de SMN y con un patrón granular en los axones de ambos músculos (Fig. 34). El contenido en granos fue variable en función del grosor del axón, como en los ratones silvestres. Así mismo, en ambos genotipos, se identificaron gran cantidad de granos en el terminal presináptico (Fig. 35).

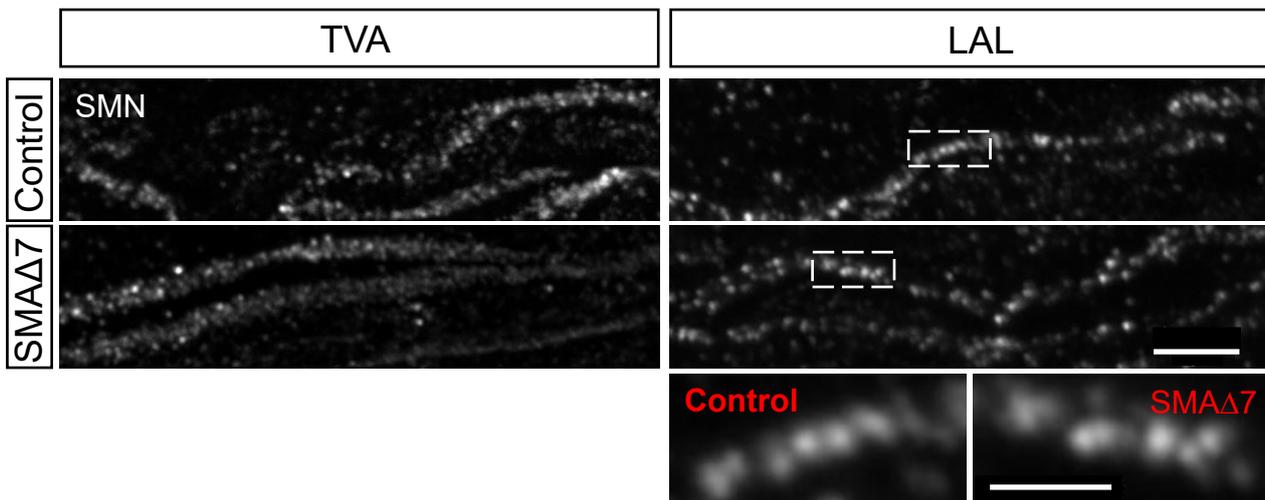


Figura 34. SMN conserva el patrón granular en los axones de ratones controles y mutantes SMA Δ 7. Proyecciones de máxima intensidad de axones motores de músculos vulnerables (TVA) y menos vulnerables (LAL) de ratones controles y mutantes a P9. Los paneles inferiores muestran con mayor detalle las regiones delimitadas, observándose el patrón granular. Barras de escala: 5 μ m (imágenes superiores) y 2 μ m (recuadros inferiores).

A continuación, cuantificamos el área de SMN normalizada al área postsináptica en controles y mutantes y la comparamos con la existente en ratones silvestres (Fig. 36). Los valores en las preparaciones del modelo fueron $6,34 \pm 1,63$ % en control (n=16 terminales, N=1) y $9,40 \pm 2,22$ % (n = 14 terminales, N = 1) en mutantes. Estos valores, fueron significativamente distintos ($p = 0,0003$, test de ANOVA; post-hoc: test de Bonferroni, $p < 0,05$ y $< 0,0005$, en control y mutante, respectivamente) de los obtenidos a una edad similar (P10) en los ratones silvestres, representando un 540 % y 800 % de incremento, respectivamente.

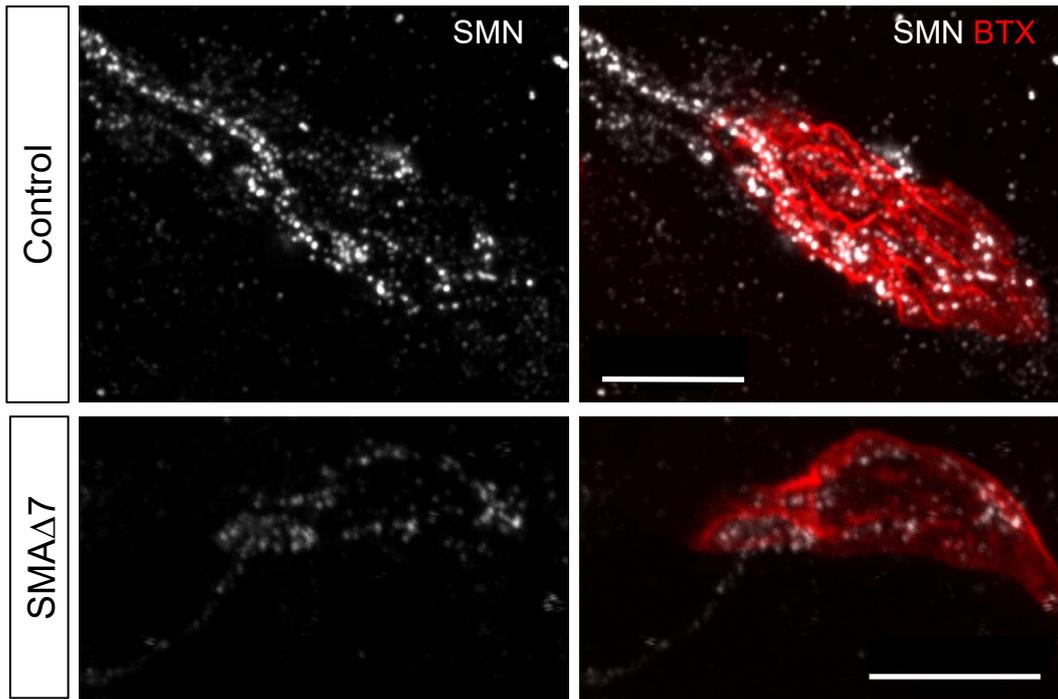


Figura 35. SMN conserva el patrón granular en los terminales motores de ratones controles y mutantes SMAΔ7. Proyecciones de máxima intensidad de terminales motores del músculo TVA en ambos genotipos a P9. La placa motora fue identificada mediante marcaje con BTX-Rodamina (rojo). Barras de escala: 10 μ m.

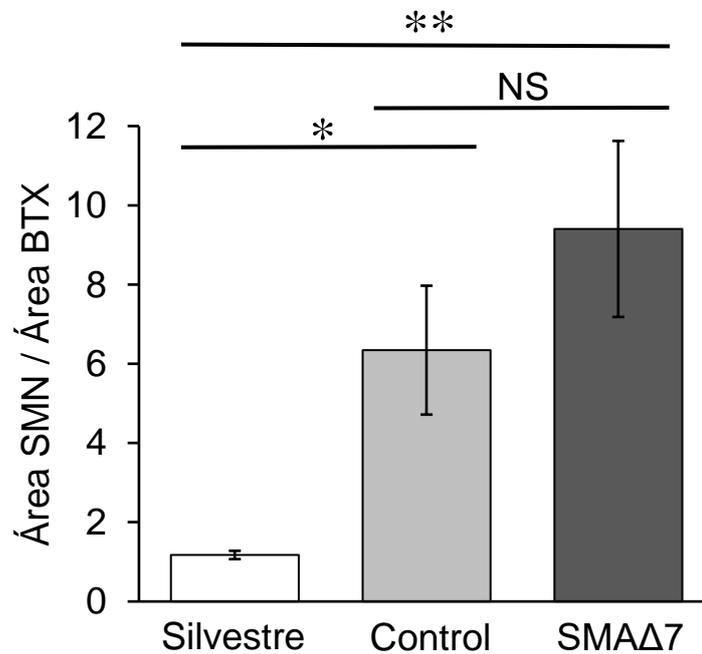


Figura 36. Cuantificación de la sobreexpresión de SMN en los terminales presinápticos motores de ratones del modelo SMAΔ7. Comparación del área de SMN (o Snn) normalizada al área postsináptica (BTX) entre ratones silvestres, controles y mutantes SMAΔ7. El análisis se realizó en ratones de edades comprendidas entre P9-P10.

Posteriormente, comparamos las características morfológicas aparentes de los granos procedentes de ratones silvestre con las de los granos de ratones que sobreexpresan proteína truncada (Fig. 37). El análisis del diámetro mediante perfil de intensidad reveló un diámetro medio significativamente mayor en los ratones que sobreexpresan proteína truncada, con un incremento del 20-28% respecto al diámetro medio observado en los ratones silvestre ($p = 0,0024$, test de ANOVA; post-hoc: test de Bonferroni, $p < 0,005$ y $< 0,05$, en mutante y control, respectivamente). Por otro lado, los granos en animales mutantes y controles presentaban un diámetro medio similar (post-hoc: test de Bonferroni, $p > 0,05$), con unos valores medios de $451,7 \pm 11,6$ nm ($n = 70$ granos, 26 axones, $N = 3$) y $424,9 \pm 14,5$ nm ($n = 90$ granos, 25 axones, $N = 4$), respectivamente (Fig. 37A). La comparación de los rangos de diámetros de los granos en los ratones silvestres (300-500 nm) y en el modelo se muestra en el histograma de frecuencias en la (Fig. 37B).

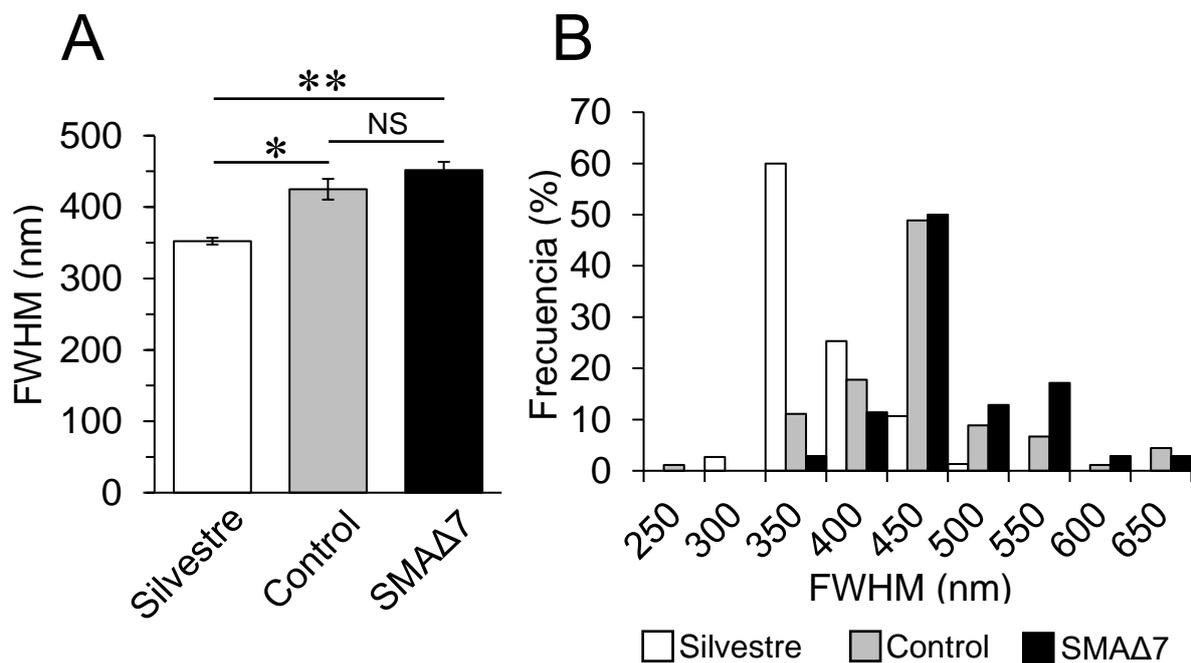


Figura 37. Los granos de SMN son de menor tamaño en los ratones silvestres que en el modelo de AME. Análisis del diámetro de los granos positivos en Snn/SMN mediante ancho un-medio en ratones silvestres P3 y en ratones controles y mutantes del modelo SMAΔ7 a P9. **A.** Cuantificación del diámetro medio de los granos. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,005$. **B.** Histograma de frecuencias del diámetro de los granos en los tres genotipos.

1.1.6. Los granos SMN visualizados con superresolución

Para aumentar la precisión de la medida del tamaño y distribución de los granos de SMN usamos microscopía de superresolución STED con un sistema compacto STEDYCON (Abberior) acoplado al nuestro microscopio confocal FV1000. El análisis de las imágenes STED en controles y mutantes confirmó el patrón granular del inmunomarcaje y permitió una mejor caracterización de los granos. En la Figura 38 se muestra un ejemplo donde se compara las imágenes confocales convencionales y STED en ratones controles y AME. La identificación de las estructuras granulares fue mucho mejor con STED y aún pudo mejorarse más la imagen cuando se le aplicó una rutina de deconvolución (Huygens).

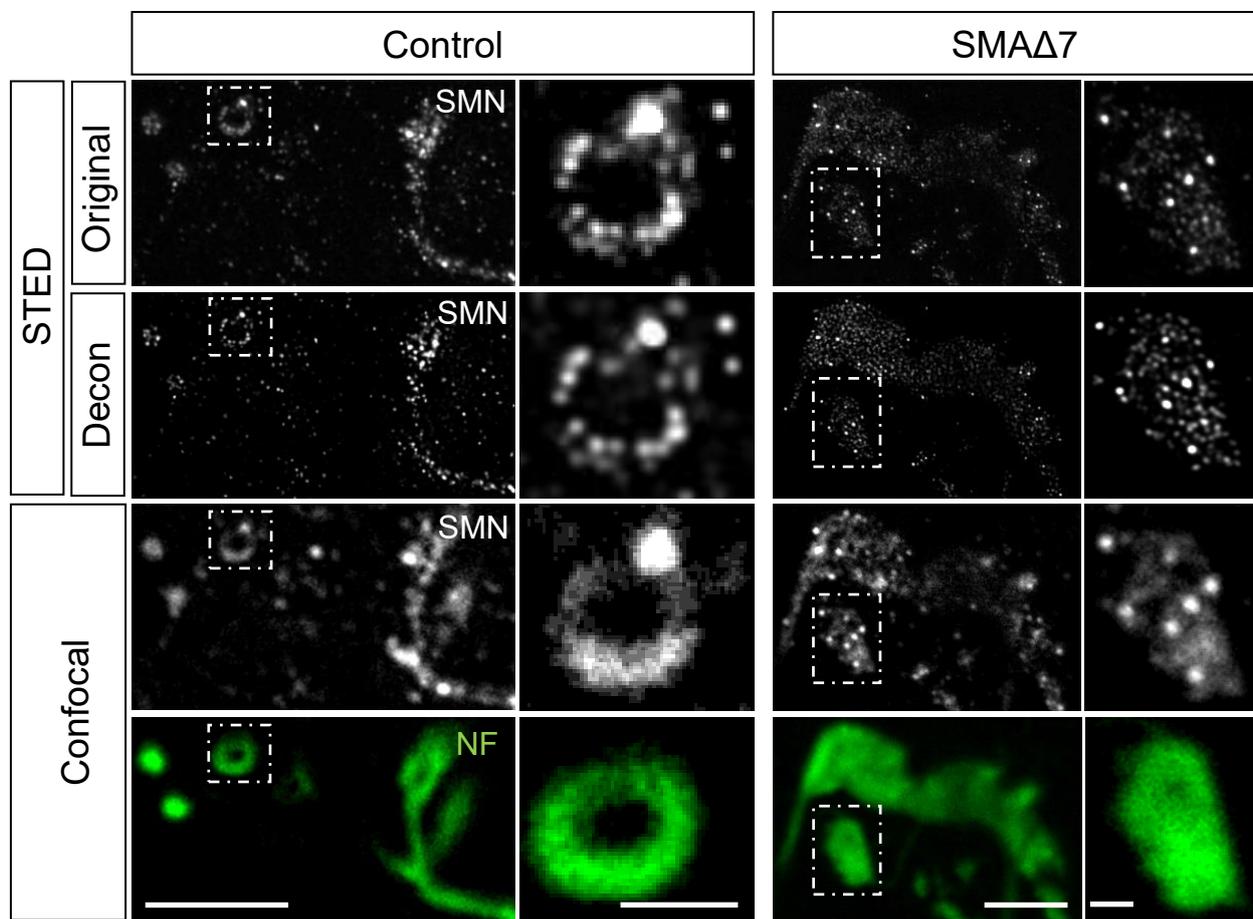


Figura 38. Granos de SMN con microscopía de superresolución en terminales nerviosos motores de ratones controles y mutantes SMA Δ 7. Comparación de las señales de inmunofluorescencia de SMN (blanco) con superresolución y microscopía confocal en terminales nerviosos motores del músculo TVA a P9. Las ramas axonales intraterminales se marcaron con anticuerpos contra NF (verde). Nótese la estructura en forma de anillo al final de la ramificación en el control y la estructura en forma de placa en el mutante (recuadros) ampliadas en los paneles de la derecha en cada genotipo. Barras de escala: 5 μ m y 1 μ m (recuadros).

El análisis del diámetro de los granos con superresolución se realizó del mismo modo que en la microscopía confocal convencional (Fig. 39A). El tamaño medio de los granos fue similar entre ratones controles y mutantes (Fig. 39B) ($p = 0,3$; test de la t de Student de dos colas), con un valor medio de $103,4 \pm 2,32$ nm (73 granos, 2 terminales) y $100,31 \pm 1,93$ nm (77 granos, 2 terminales), respectivamente, coincidente con la resolución óptica que obtuvimos en estos experimentos.

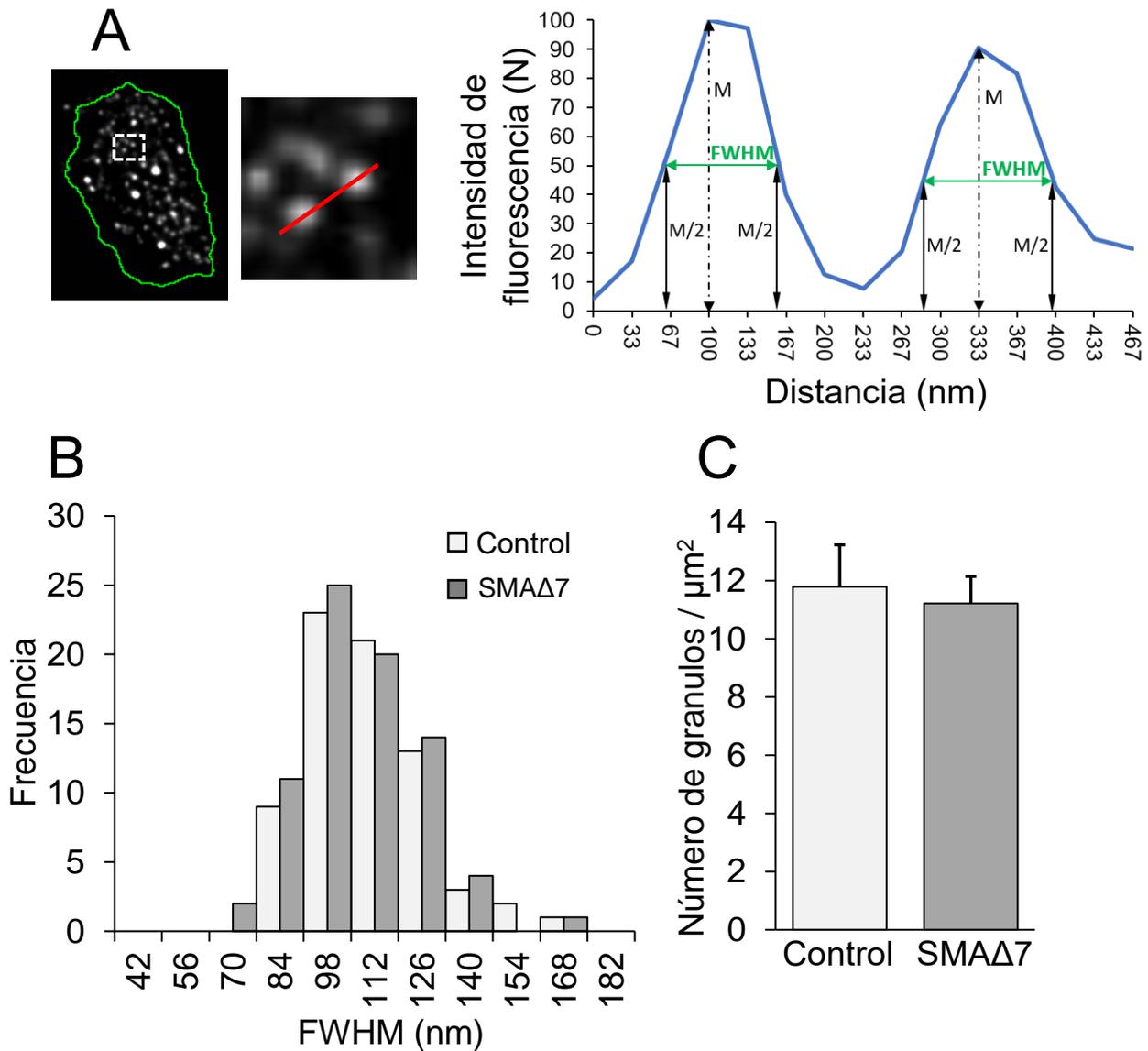


Figura 39. El análisis mediante microscopía de superresolución pone de manifiesto que los granos de SMN son similares morfológicamente en ratones controles y AME. A. Ejemplo de análisis de perfil de intensidad en dos granos (paneles izquierdos) para el estudio de su diámetro. El panel derecho muestra un esquema conceptual del ancho un-medio (FWHM) sobre los perfiles de intensidad de los granos de los paneles izquierdos. B. Histograma de frecuencias de diámetros de granos en terminales nerviosos de ratones controles y mutante. C. Densidad media de los granos en las ramas axónicas extra e intraterminales.

Así mismo, la densidad media de granos fue similar en ambos casos, con un valor medio en los acúmulos de 12 granos/ μm^2 (Fig. 39C). Sin embargo, aunque no se encontraron diferencias significativas en la intensidad máxima de los granos ($p = 0,76$, test de la U de Mann-Whitney), sí se observaron diferencias significativas en la intensidad media de los granos entre genotipos (Fig. 40A; $p = 0,0021$, test de la U de Mann-Whitney de dos colas), con unos valores medios de $499,3 \pm 32,13$ en control (73 granos, 2 terminales) y $418,9 \pm 34,41$ en mutantes (77 granos, 2 terminales). Finalmente, la intensidad media de los granos no correlacionaba con su diámetro (Fig. 40B; $R^2 = 0,08$ y $0,019$ en control y mutante, respectivamente).

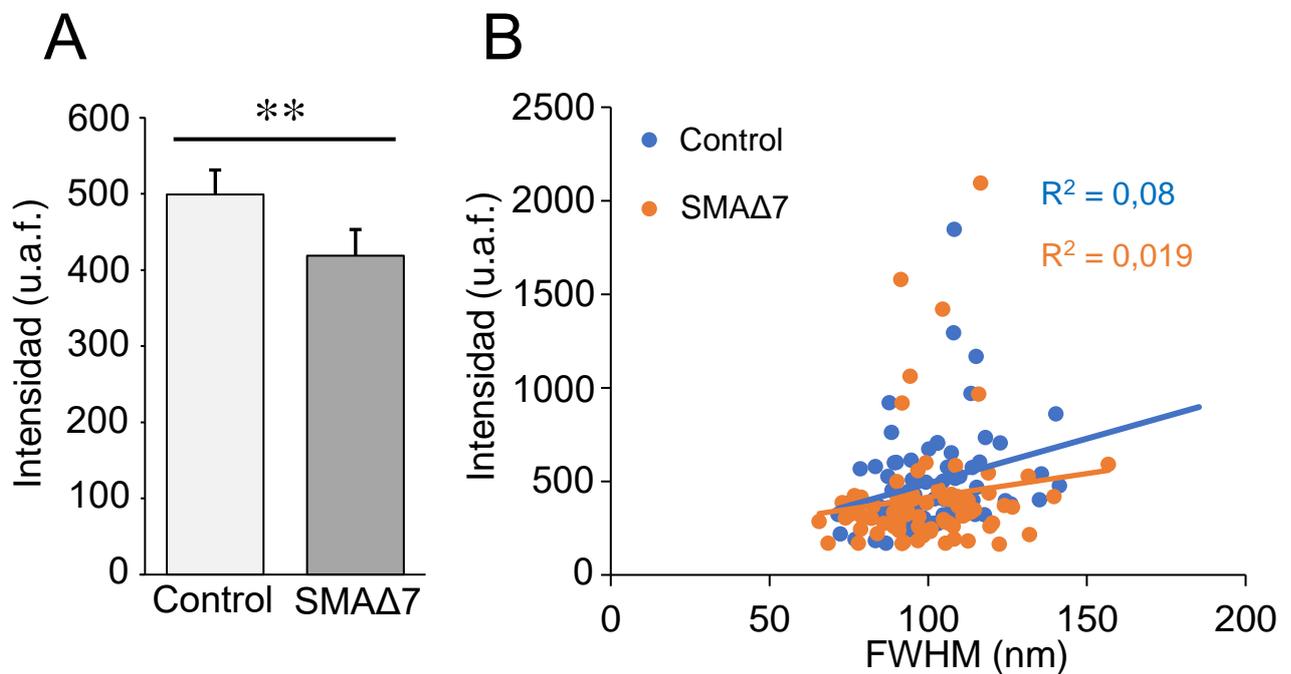


Figura 40. Los granos de SMN presentan una menor intensidad media en los terminales presinápticos de ratones mutantes SMAΔ7. A. Valores medios de intensidad de los granos de SMN en ratones controles (control) y AME (SMNΔ7). **B.** Gráfica de intensidad-ancho un-medio que muestra la ausencia de correlación entre ambas variables. **: $p < 0,005$

1.2. Relación entre SMN y el citoesqueleto

1.2.1. Bases de la distribución espacial intraterminal de los granos de SMN

Tras estudiar tanto las características morfológicas de los granos de SMN en ratones silvestres y modelo de AME, como su distribución espacial, investigamos el posible soporte estructural de su localización en el terminal presináptico motor.

Como se puede apreciar en las imágenes, el primer hallazgo notable fue que los granos de SMN, a diferencia de otras proteínas de la NMJ como la proteínas SV, no se distribuyen homogéneamente en el terminal sino formando básicamente dos tipos de estructuras: cúmulos (Fig. 41, puntas de flechas azules) y agrupaciones lineales (Fig. 41, puntas de flechas amarillas). Ambas estructuras aparecieron generalmente interconectadas entre sí en el terminal y, a su vez, con la porción distal del axón. También se observaron estructuras circulares de granos, generalmente en las porciones distales del terminal (Fig. 38). En de la porción más distal del axón motor se observó en algunos casos un cúmulo de granos (Fig. 41, flechas blancas), siendo más frecuente éste fenómeno en los ratones mutantes que en los controles o silvestres (véase más adelante).

La característica distribución de los granos planteó la posibilidad de una asociación entre éstos y el citoesqueleto. Esta posibilidad cobra aún más interés si se tiene en cuenta que el citoesqueleto es uno de los elementos característicamente alterado en AME.

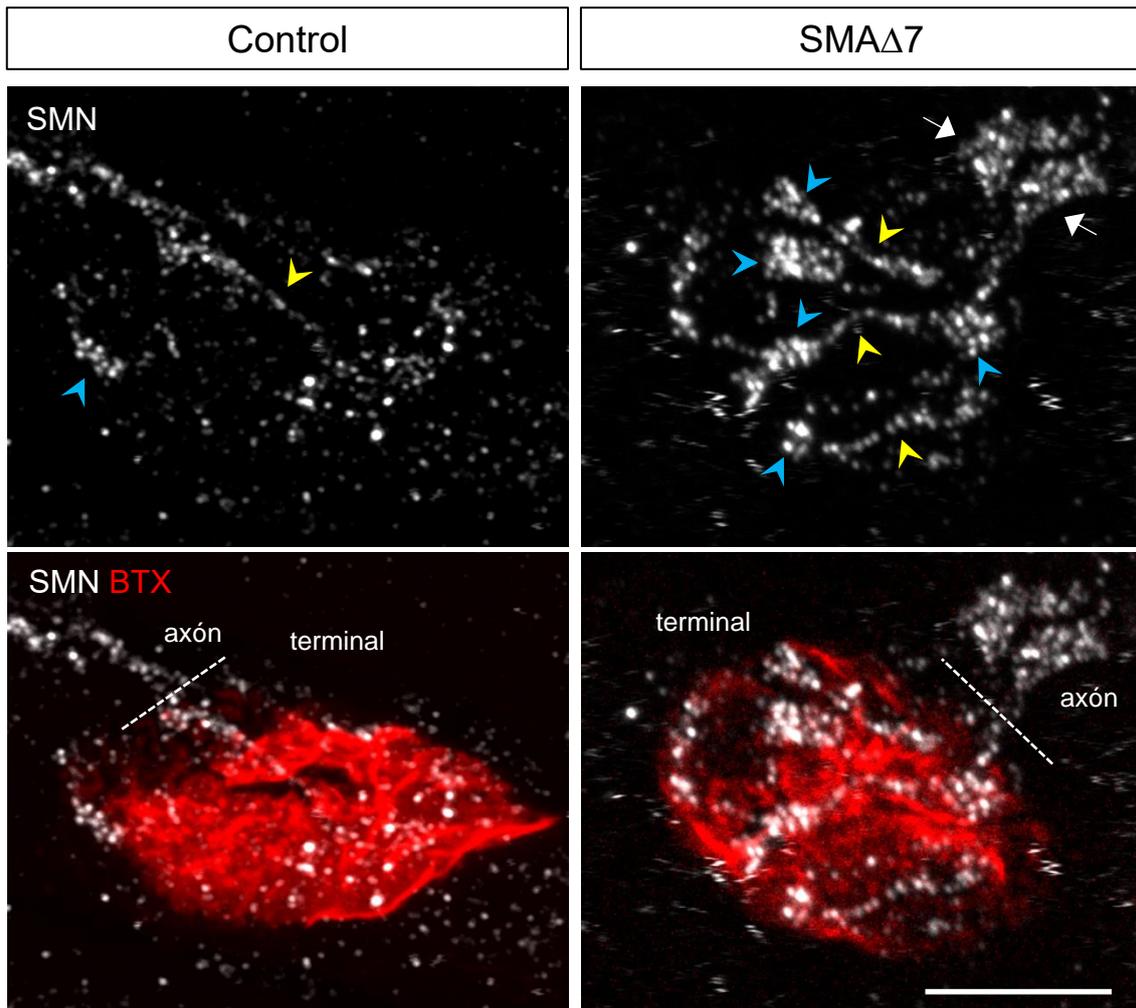


Figura 41. Los granos de SMN se distribuyen en el terminal formando cúmulos y estructuras lineales. Proyecciones de máxima intensidad de terminales presinápticos motores de ratones control y mutante AME que muestran la distribución típica de SMN en esta localización: formando cúmulos (puntas de flechas azules) estructuras lineales (puntas de flechas amarillas). Nótese el cúmulo a nivel de la porción distal del axón (flechas blancas) en el mutante. En los paneles inferiores se muestran las imágenes con el marcaje postsináptico (BTX-Rodamina). Barra de escala: 10 μ m

1.2.2. SMN se asocia espacialmente a MAP1B en mutantes y controles

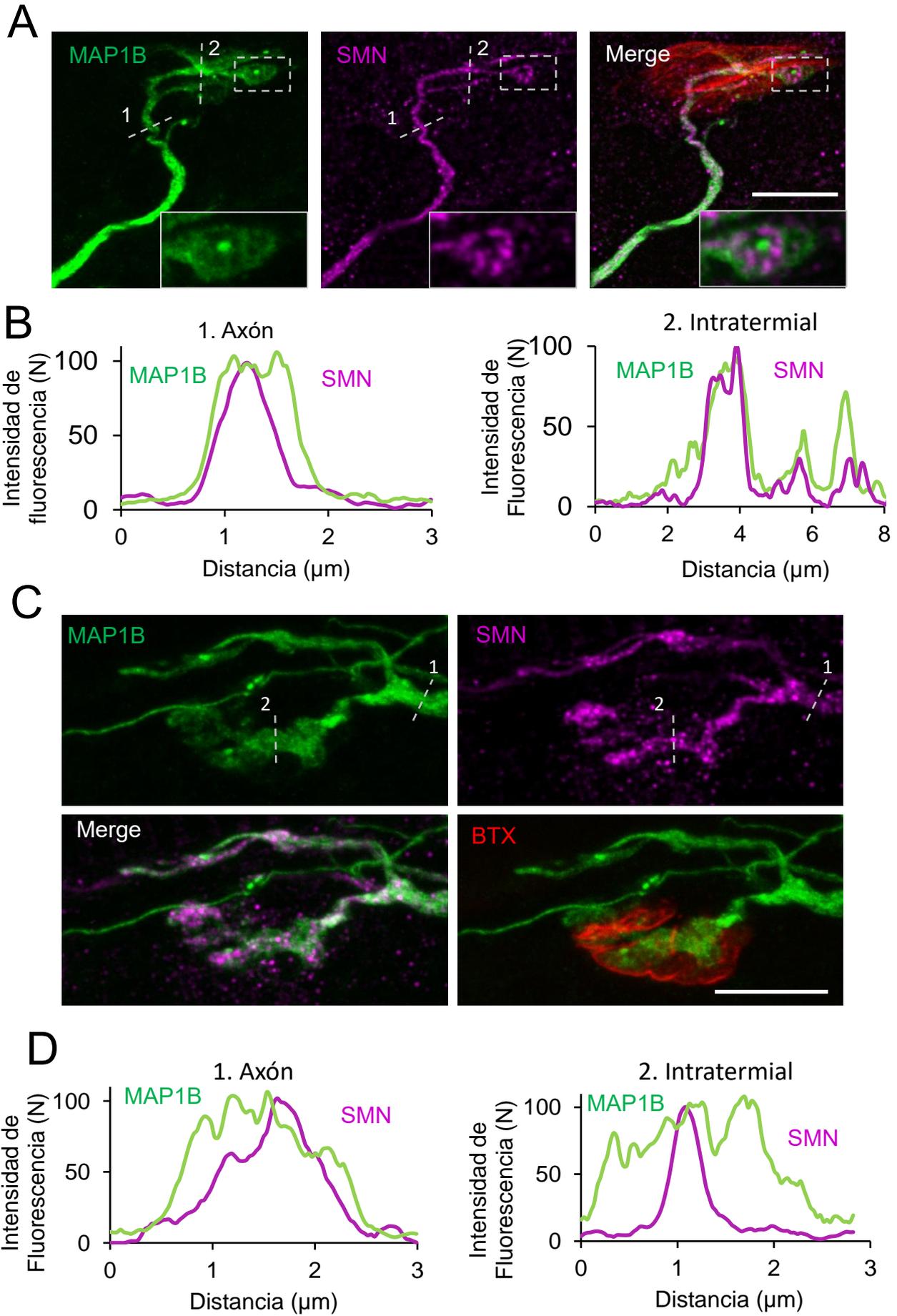
Uno de los elementos citoesqueléticos afectados en AME son los microtúbulos (MT) (Wen *et al.*, 2010; Torres-Benito *et al.*, 2011; Torres-Benito, 2012). Así mismo, en trabajos previos de nuestro laboratorio, hemos mostrado que la distribución intraterminal de la proteína MAP1B presenta signos de retraso madurativo en AME (Torres-Benito, 2012). MAP1B está implicada en la dinámica y estabilización de los microtúbulos durante

el desarrollo y la maduración sináptica y se ha descrito que *in vitro* interacciona con HuD (Fujiwara *et al.*, 2011), proteína asociada a SMN en los granos axonales (Akten *et al.*, 2011; Fallini *et al.*, 2011). Por todo ello indagamos la posible relación espacial entre MAP1B y SMN en los terminales nerviosos motores durante la maduración postnatal.

Estudiamos la relación espacial entre MAP1B y SMN en axones y terminales motores en el músculo TVA a P7 mediante doble marcaje inmunohistoquímico en el modelo Taiwanés de AME. En este modelo la expresión de SMN presentó características similares a las observadas en el modelo SMN Δ 7.

En la Figura 42 se muestra dos ejemplos representativos de la señal de SMN y MAP1B en axones y terminales nerviosos motores. En los axones la señal de MAP1B fue intensa y continua tanto en control (Fig. 42A) como en mutante (Fig. 42C). La señal de MAP1B fue coincidente con la señal de SMN como se muestra en los perfiles lineales (Fig. 42B y D, gráficos izquierdos). En los terminales presinápticos, sin embargo, MAP1B presentó una distribución fundamentalmente difusa, más acusada en los mutantes, y no fue infrecuente encontrar estructuras redondeadas en las porciones finales. (Fig. 42A, recuadro). La señal de SMN fue coincidente con la de MAP1B, tanto con las ramas como con las estructuras finales de MAP1B (Fig. 42B, gráfico derecho). En los terminales mutantes, los granos de SMN aparecieron fundamentalmente como acúmulos pero dentro de la distribución de MAP1B (Fig. 42D). Estos resultados, por tanto, muestran cierto grado de colocalización entre MAP1B y SMN

Figura 42 (página siguiente). Los granos de SMN están espacialmente asociados a MAP1B en los terminales presinápticos motores. A. Proyecciones de máxima intensidad de una unión neuromusculares ratones control. La trayectoria de los granos de SMN (magenta) coincide con la señal de MAP1B (verde), tanto en el axón (1) como en el terminal presináptico (2). En algunos terminales, MAP1B forma estructuras redondeadas en las porciones más distales con presencia de granos de SMN (recuadro). **B.** Perfil lineal de intensidad de MAP1B (verde) y SMN (magenta) en los segmentos 1 y 2 indicados en A. **C.** Proyecciones de máxima intensidad de una unión neuromuscular de un ratón mutante AME. MAP1B presenta una distribución difusa. **D.** Perfil lineal de intensidad de MAP1B (verde) y SMN (magenta) en los segmentos 1 y 2 indicados en C. Nótese que la señal de SMN está englobada por la señal de MAP1B. Barras de escala: 10 μ m.



1.2.3. SMN se asocia a los NF

Dado el papel de soporte estructural de los NF y su afectación en la AME (Cifuentes-Diaz *et al.*, 2002; Kariya *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010; Torres-Benito *et al.*, 2011; Torres-Benito, 2012), estudiamos la posible relación espacial entre los NF y los granos de SMN mediante doble marcaje inmunohistoquímico para NF (NF-M) y SMN.

En los animales silvestres, los NF mostraron una disposición ramificada, finalizando en algunos casos en estructuras con forma de lazo. Además, aparecieron también algunas pequeñas estructuras saculares, de pequeño tamaño, a lo largo del recorrido de las ramas intraterminales. Al estudiar la distribución espacial de los granos de SMN y compararla con la trayectoria de los NF, encontramos una estrecha correlación, correspondiendo, además, los cúmulos de granos con los pequeños engrosamientos de los NF (Fig. 43).

En los animales controles del modelo SMA Δ 7, los NF siguieron una disposición similar a las observadas en los terminales presinápticos de ratones silvestres. La Figura 43 muestra ejemplos representativos de un terminal presináptico silvestre, control y mutante. En los tres genotipos, los granos de SMN aparecieron espacialmente relacionados con las ramas y los lazos de NF (Fig. 43, paneles inferiores). Obsérvese, sin embargo, que en el mutante aparece un cúmulo de NF a la entrada del axón en el terminal (flecha) y que en él la densidad de granos de SMN es muy alta (véase más adelante).

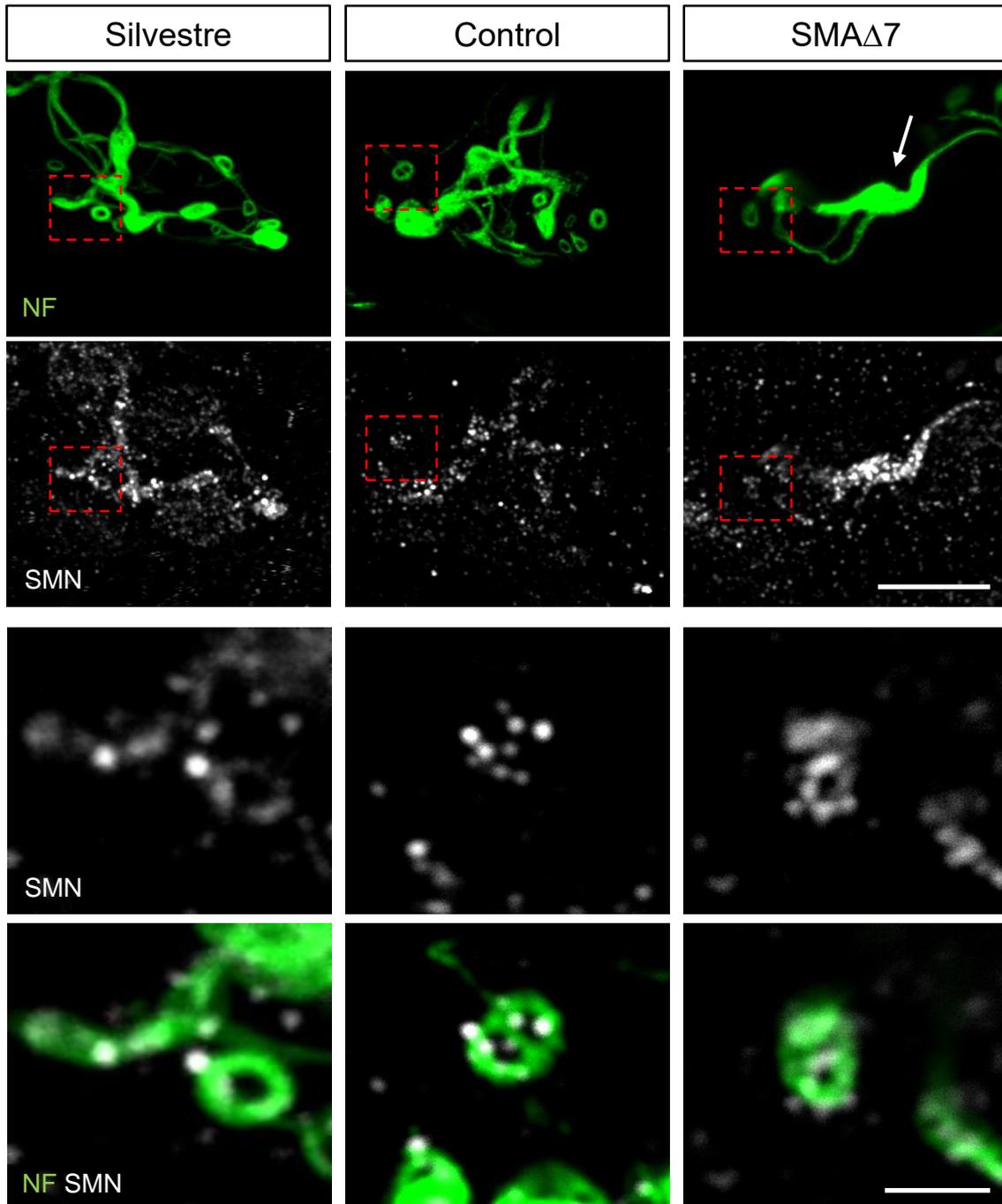


Figura 43. Los granos de SMN están espacialmente asociados a los NF en los terminales presinápticos motores. Los seis paneles superiores muestran proyecciones de máxima intensidad de uniones neuromusculares de ratones silvestre a P3 y control y mutante SMA Δ 7 a P9. Los granos de SMN (gris) se disponen coincidentes a las ramas intraterminales de NF (verde). Nótese, que en el mutante aparece un cúmulo de NF a la entrada del axón en el terminal (flecha) coincidente con una alta densidad de granos de SMN. Las regiones delimitadas se muestran con mayor detalle en los seis paneles inferiores, donde puede observarse la coincidencia entre NF y SMN a nivel de los lazos terminales. Barras de escala: 10 μ m (paneles superiores) y 2 μ m (paneles inferiores).

1.2.4. Relación entre NF y MAP1B

Tanto MAP1B como los NF son proteínas que, entre otras funciones, participan en el desarrollo y maduración neuronal. Si bien no se ha descrito ninguna interacción directa entre ellas, ambas interactúan con los MT. Por un lado, la proteína Futsch, análoga en *Drosophila* de MAP1B, mantiene la integridad de los MT en NMJ en expansión (Ross et al., 2000; Godena *et al.*, 2011). Por otro lado, las cadenas laterales de los NF regulan la densidad de MT y el calibre del axón, existiendo una correlación inversa entre contenido de MT y de NF en este compartimento (Lariviere & Julien, 2004; Yuan *et al.*, 2017). En AME, ambas proteínas están alteradas a nivel de la NMJ, por un lado, con dispersión y reducción de los niveles de MAP1B (Torres-Benito, 2012) y, por otro, con retraso madurativo de los NF y su posterior acumulación (Cifuentes-Diaz *et al.*, 2002; Kariya *et al.*, 2008; Torres-Benito, 2012). Dado que los granos de SMN siguen la trayectoria tanto de MAP1B como de los NF, comparamos a continuación la relación espacial entre ambas proteínas del citoesqueleto en axones y terminales motores en los distintos genotipos.

En los axones, la intensidad en el marcaje de ambas proteínas fue variable incluso en axones adyacentes. Ejemplos representativos de esta heterogeneidad se muestra en la Figura 44. Tanto en ratones silvestres como en controles y mutantes AME, la señal de ambas proteínas correlacionaba inversamente, siendo especialmente llamativo que los axones con un marcaje más intenso para MAP1B presentaban escasa señal para NF, y viceversa. Estos resultados sugieren que existen distintas poblaciones de axones en cuanto a su composición relativa de NF y MAP1B.

A continuación, nos preguntamos si también el contenido en granos de SMN sería heterogéneo entre los axones de uno u otro tipo. Para resolver esta cuestión realizamos un triple marcaje para MAP1B, NF y SMN (Fig. 45A). Así, pudimos comprobar que contenido en granos de SMN correlacionó mejor con la señal de NF, es decir, con aquellos axones con mayor intensidad para NF (Fig. 45B, puntas de flecha), que con los que presentaron una señal más débil. Fue llamativo encontrar axones con un alto contenido en MAP1B, pero carentes de granos de SMN (Fig. 45B, flechas). Estos datos sugieren que los granos de SMN tienden a expresarse en axones ricos en NF.

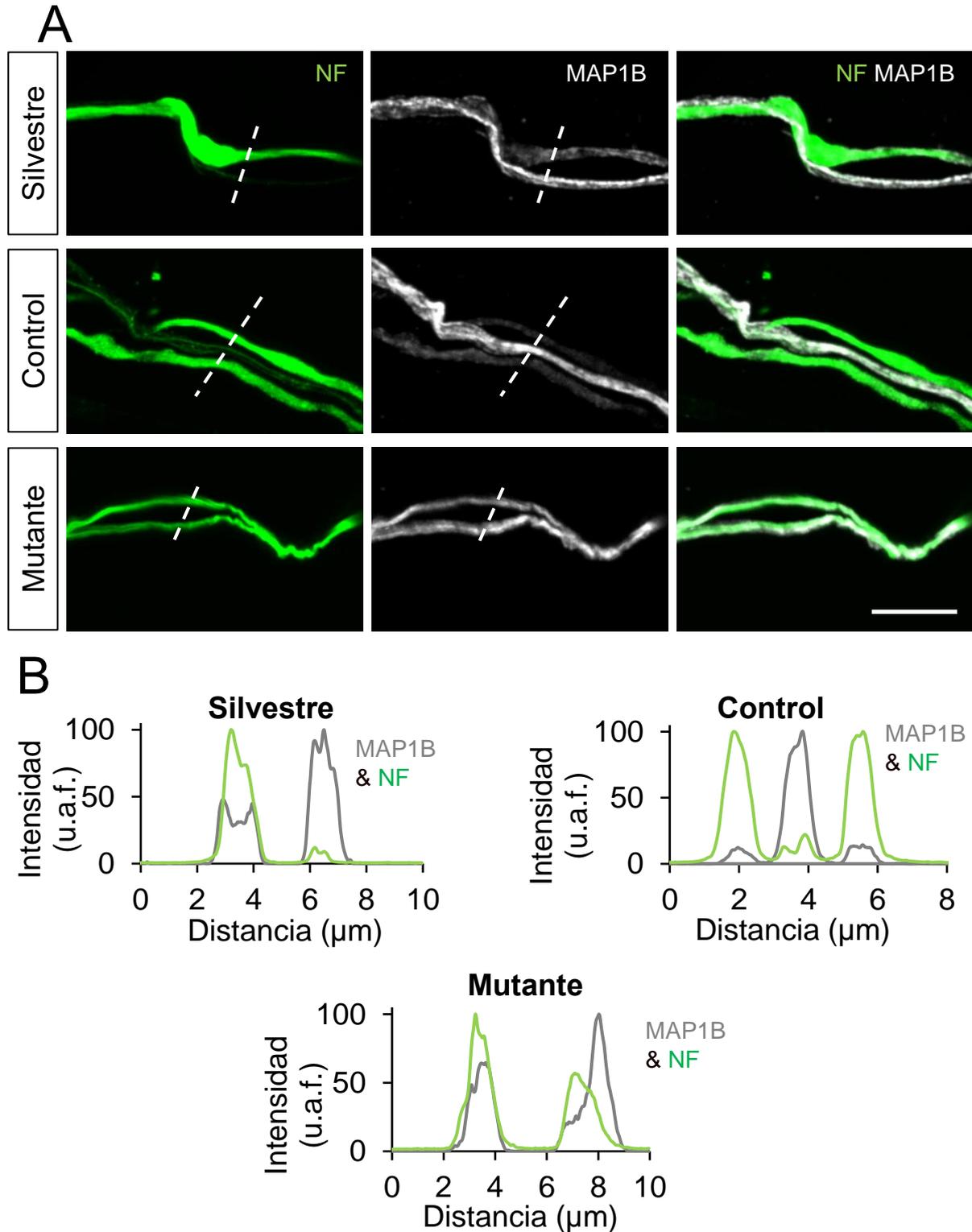


Figura 44. Lo axones periféricos presentan un contenido heterogéneo de MAP1B y NF. A. Proyecciones de máxima intensidad de axones procedentes de ratones silvestres y controles y mutante del modelo de AME Taiwanés que muestran la existencia de axones con distinta inmunoreactividad para MAP1B (gris) y NF-M (verde). Barra de escala: 10 μm . **B.** Perfiles de intensidad de los segmentos indicados en A que muestran la correlación inversa entre las señales normalizadas de MAP1B (trazo gris) y NF (trazo verde).

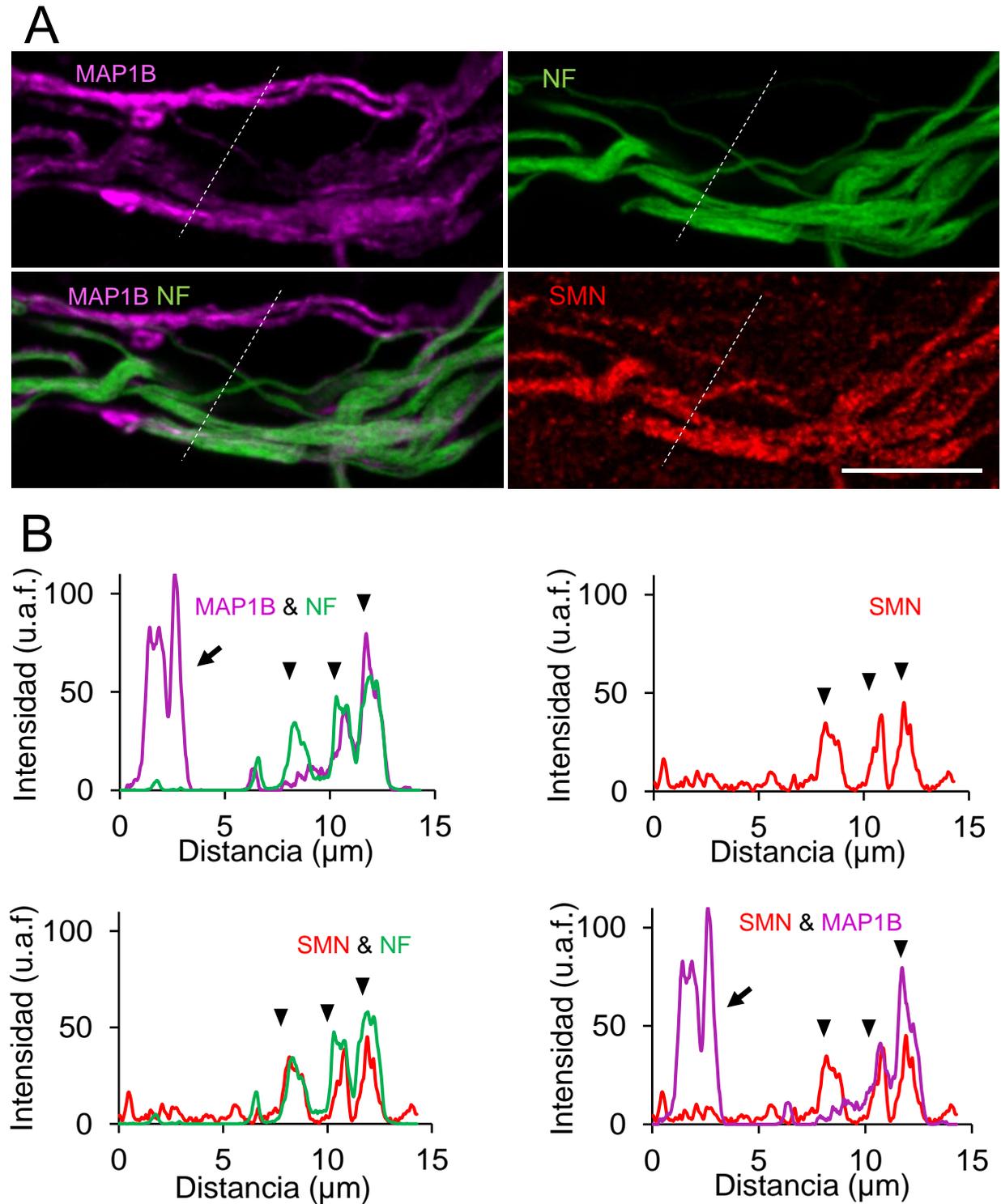


Figura 45. Los granos de SMN presentan un mayor grado de coincidencia con la señal de NF que con la de MAP1B. **A.** Proyección de máxima intensidad de una banda de axones procedentes de un ratón control del modelo Taiwanés marcados para MAP1B (magenta), NF (verde) y SMN (rojo). Nótese la heterogeneidad de los axones en cuanto a su inmunoreactividad para cada una de estas proteínas. Barra de escala: 10 μm . **B.** Perfiles de intensidad de los segmentos indicados en A que muestra la mayor coincidencia de SMN (trazos rojos) con axones con alta intensidad para NF (trazos verdes) (puntas de flecha) que con axones con alto contenido en MAP1B (trazos magenta) (flecha).

Finalmente, investigamos la distribución espacial de MAP1B y los NF en el terminal nervioso motor. En ratones silvestres y controles, ambas proteínas colocalizaron en gran medida tanto en la porción distal de los axones como en los terminales presinápticos (Fig. 46). En los mutantes, sin embargo, MAP1B presentó un patrón difuso-granular (Fig. 46, recuadro). Es de destacar que en los terminales mutantes la señal de MAP1B coincidió con los acúmulos anómalos de NF (Fig. 46, punta de flecha, véase apartado 2.5). No obstante, no existió concordancia de intensidades entre ambas señales, puesto que, si bien eran las regiones más intensas para NF, no era así para MAP1B.

Estos datos, en su conjunto, sugieren una asociación más estrecha de los granos de SMN con los NF que con MAP1B, tanto en los axones como en el terminal presináptico motor.

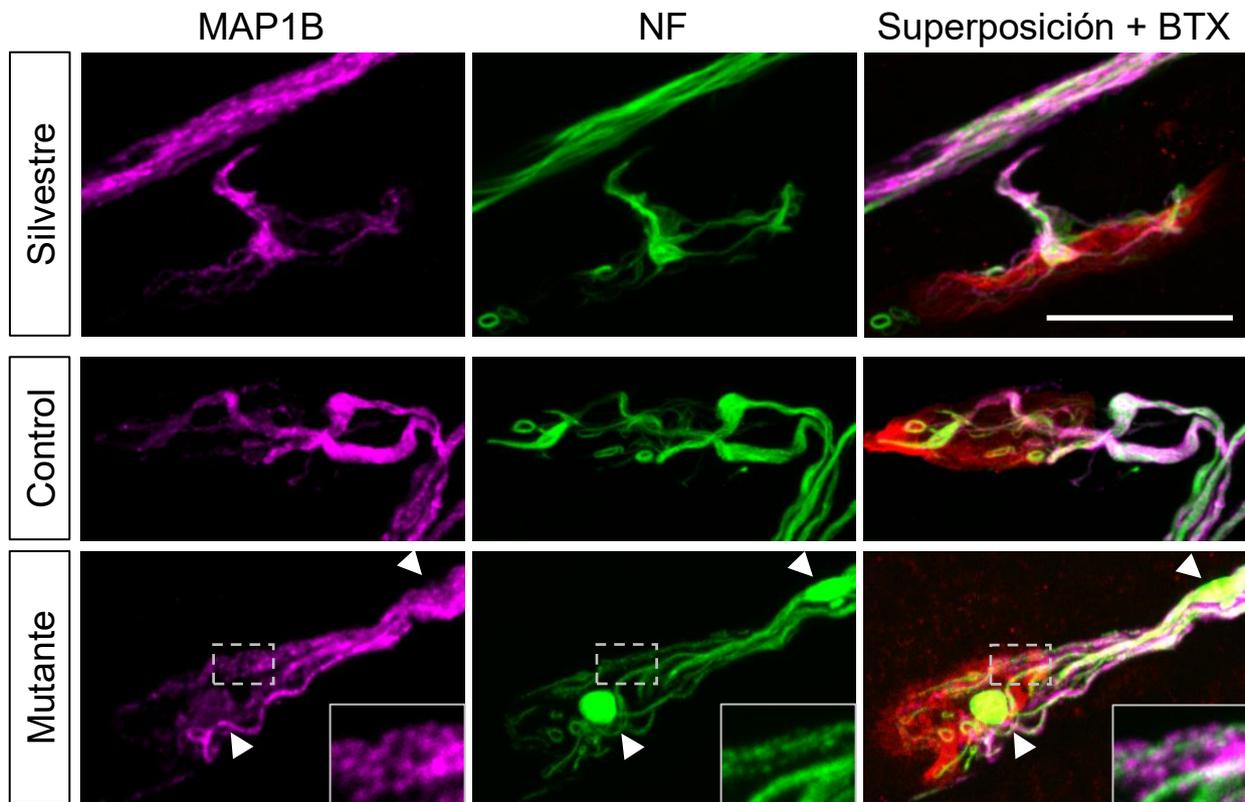


Figura 46. Disposición de MAP1B y NF en los terminales motores silvestres, controles y modelo de AME. Proyecciones de máxima intensidad representativas de la expresión y distribución de MAP1B (magenta) y NF (verde). En los terminales de ratones silvestres y controles, la señal de MAP1B colocaliza con la de NF. En los terminales mutantes, MAP1B se dispersa, observándose cierto patrón granular (recuadro). Nótese que los acúmulos de NF no coinciden con una mayor densidad de MAP1B (puntas de flechas). Barra de escala: 10 μ m.

1.2.5. Los acúmulos de NF presentan una alta densidad de granos de SMN

Los NF en los terminales presinápticos de los ratones mutantes SMA Δ 7 presentaron acúmulos junto con un bajo número de ramas intraterminales (Fig. 47A), tanto en las porciones terminales (lazos) como en las proximales. Es más, aproximadamente un 20% los terminales presentaron un único acúmulo de NF que ocupaba la mayor parte del terminal (Fig. 47B). Hay que destacar la gran abundancia de granos de SMN en los acúmulos de NF (Fig. 47A y B). Estas estructuras no se observaron ni en los ratones controles ni en el modelo silvestre.

En los axones, también se encontraron acumulaciones de granos de SMN coincidiendo con acúmulos de NF, especialmente abundantes en los ratones mutantes. (Fig. 48, paneles derechos). En los ratones controles, que sobreexpresan SMN, los acúmulos de NF en los axones fueron muy poco frecuentes, uno de los pocos ejemplos observados se muestra en la Figura 48 (paneles izquierdos). No obstante, es de resaltar que también en estos casos se observó una mayor densidad de granos de SMN, lo que indica la estrecha relación entre ambas proteínas.

Estos resultados sugieren un compromiso en el tráfico retrógrado o en la degradación de los granos de SMN en los ratones AME.

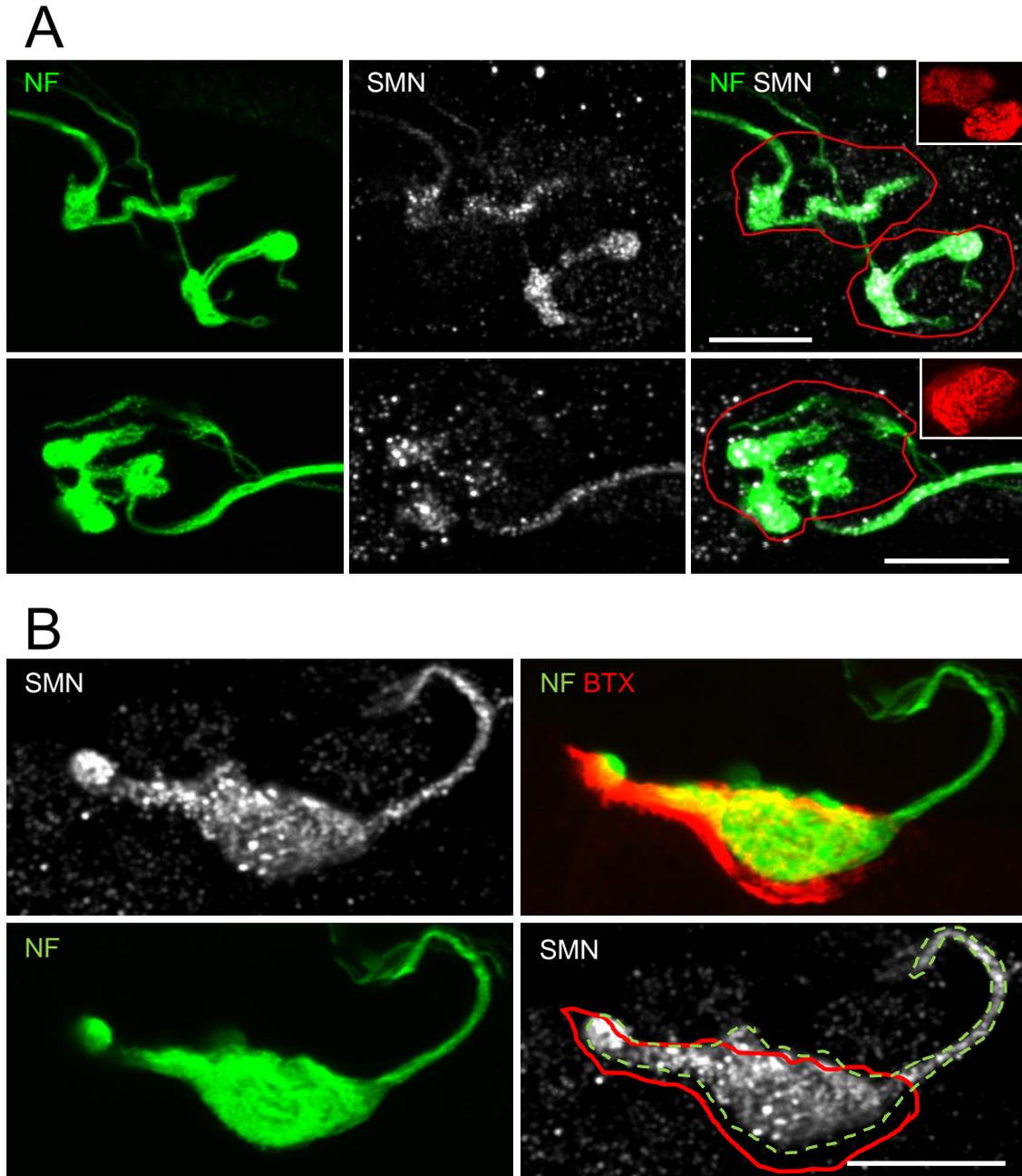


Figura 47. Los terminales motores mutantes presentan acúmulos anómalos de NF y SMN en el modelo SMA Δ 7. Proyecciones de máxima intensidad de terminales motores del TVA procedentes de ratones SMA Δ 7 a P9. **A.** Ejemplos de terminales motores con escasas ramificaciones y distintos acúmulos de NF (verde). Se observan acumulaciones de granos de SMN (blanco) coincidentes con los acúmulos de NF. **B.** Terminal mutante muy degenerado, con una única acumulación masiva de NF que ocupa gran parte del terminal, conteniendo un abundante número de granos de SMN. La línea verde discontinua representa el contorno de los NF y la roja delimita el contorno del terminal postsináptico. Barras de escala: 10 μ m

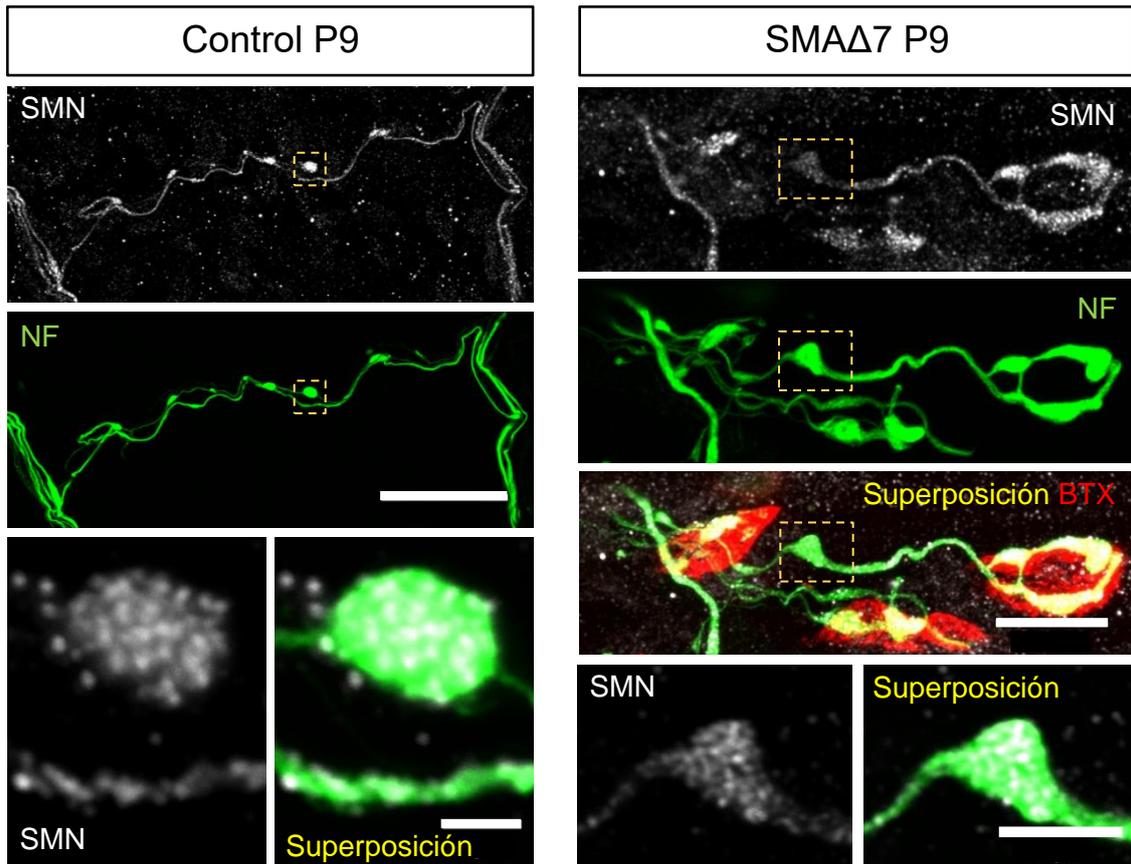


Figura 48. Los axones presentan acúmulos de NF a lo largo de su recorrido en el modelo SMA Δ 7. Los acúmulos axonales de NF coinciden con acumulaciones de granos de SMN, tanto en controles como en mutantes del modelo SMA Δ 7. Los paneles inferiores (recuadros) muestran detalles de la superposición de los granos de SMN con los acúmulos de NF. Barra de escala: 40 y 2 μ m (paneles izquierdos) y 15 y 5 μ m (paneles derechos).

1.3. Estudio de proteínas potencialmente asociadas a SMN

Puesto que diversos estudios *in vitro* en modelos de AME han mostrado una alteración en la localización axonal de SMN y de distintas proteínas asociadas, como IMP1, hnRNP-R o HuD en motoneuronas y en neuronas centrales (Akten *et al.*, 2011; Fallini *et al.*, 2011, 2014, 2016; Hubers *et al.*, 2011; Donlin-Asp *et al.*, 2017), hipotetizamos que *in vivo* la composición de los gránulos de SMN en los axones motores se encuentra alterada en el contexto de la AME. Con el objetivo de poder contrastar esta hipótesis, estudiamos la expresión de distintas proteínas potencialmente asociadas a los gránulos de SMN mediante marcaje inmunohistoquímico en preparaciones neuromusculares y de médula espinal. Concretamente, realizamos inmunomarcaje de tres proteínas: Gemina 2, Gemina 3 y HuD, en ratones silvestres y modelo SMA Δ 7 (Tabla IX y X). Además, testamos la presencia de una cuarta proteína, Cpg15 que, aunque no ha sido demostrado que interaccione con SMN *in vitro*, la incluimos en nuestro estudio ya que está implicada en el neurodesarrollo y su ARNm es estabilizado por HuD.

Como la expresión de algunas de estas proteínas potencialmente se regula a la baja a lo largo de la maduración del sistema nervioso, optamos por realizar los marcajes a una edad temprana (P3). No obstante, ninguna de las cuatro proteínas fue detectada en las preparaciones neuromusculares. También se realizó inmunomarcaje a P0, tanto en el TVA como en el diafragma, con iguales resultados (Tabla IX). En principio, interpretamos estos resultados como un problema de accesibilidad de los anticuerpos a los epítetos correspondientes, más que a la ausencia de estas proteínas en el axón y el terminal nervioso (véase más adelante *Discusión*).

Así mismo, investigamos la expresión de Gemina2, Gemina3, HuD y Cpg15 en el soma de las motoneuronas espinales de ratones de 9 días de edad. Para ello realizamos marcajes inmunohistoquímicos en cortes de médula espinal lumbar (L1-L2), identificando estas neuronas por su localización en el asta ventral de la medula e inmunoreactividad a un anticuerpo específico contra la acetil-colin transferasa (ChAT; AB144P, Merck Millipore) (Tabla X). No obstante, únicamente HuD pudo ser identificado de forma clara en estos experimentos.

Tabla IX. Experimentos realizados para la identificación por IHQ de proteínas potencialmente asociadas a SMN en axones y terminales nerviosos motores.

Genotipo	Anticuerpo					Muestra	Edad	IHQ
	[Gemin2]	[Gemin3]	[HuD]	[Cpg15]	[SMN]			
Silvestre	1:500	1:500	-	-	-	TVA	P3	Estándar
Silvestre	1:50	1:50	-	-	-	TVA	P3	Estándar
Silvestre	1:50	-	-	-	1:200	TVA	P3	SDS
Silvestre	-	-	1:500	1:500	-	TVA	P3	Estándar
Silvestre	-	-	1:500	1:500	-	TVA	P3	Estándar
Silvestre	-	-	1:50	1:50	-	TVA	P3	Estándar
Silvestre	-	-	1:50	-	-	Diafragma	P0	Estándar
Silvestre	-	-	1:50	-	-	TVA	P0	Estándar
Control	-	-	-	1:50	-	TVA	P3	Estándar

Tabla X. Experimentos realizados para la identificación por IHQ de proteínas potencialmente asociadas a SMN en secciones de médula espinal lumbar L1-L2.

Genotipo	Anticuerpo					Edad	IHQ	
	[Gemin2]	[Gemin3]	[HuD]	[Cpg15]	[ChAT]			
Control	1:50					1:250	P9	Estándar
Control		1:50				1:250	P9	Estándar
Control			1:50			1:250	P9	Estándar
Mutante			1:50			1:250	P9	Estándar
Control				1:50		1:250	P9	Estándar

1.3.1. La expresión de HuD en las motoneuronas de la médula espinal no está disminuida en ratones SMA Δ 7

La señal de HuD fue intensa en los cortes de médula espinal lumbar (L1-L2), tanto en ratones controles como mutantes. La señal se localizó fundamentalmente en la sustancia gris, tal y como se muestra en las secciones transversales de controles y mutantes de la Figura 50A. Se marcaron todas las regiones de la sustancia gris, es decir, las astas dorsales, intermediolaterales, comisura central y astas ventrales.

En las astas ventrales, se identificó inmunorreactividad para HuD tanto en las motoneuronas, identificadas mediante inmunomarcaje contra ChAT (Fig. 49A y B), como en otras células ChAT negativas de menor tamaño, posiblemente interneuronas (Fig. 49B, flechas). En las motoneuronas, la señal de HuD fue particularmente intensa en el soma y en la región más proximal de las neuritas (Fig. 49C, puntas de flechas).

Puesto que experimentos previos en pez cebra han descrito los niveles de HuD son dependientes de SMN (Hao *et al.*, 2017), hipotetizamos que los niveles de expresión de HuD pudieran estar disminuidos en las motoneuronas de los ratones mutantes del modelo SMA Δ 7. Para contrastar esta hipótesis se realizó un análisis comparativo de la señal de HuD en las neuronas del asta ventral entre ratones controles y mutantes SMA Δ 7 (Fig. 50)

La intensidad media de la señal en las motoneuronas fue similar en ambos genotipos, con unos valores medios de $1247 \pm 70,92$ u.a.f en el control ($n = 158$ neuronas, $N = 4$ ratones) y de $1203 \pm 769,1$ u.a.f. en el mutante AME ($n = 162$ neuronas, $N = 4$ ratones) ($p = 0,886$, prueba de la U de Mann-Whitney). Así mismo, tampoco se observó una diferencia significativa entre las motoneuronas y las células ChAT negativas del asta ventral en ambos genotipos ($p = 0,0796$, ANOVA de dos factores), aunque sí una tendencia a presentar estas últimas una menor intensidad, con unos valores medios de $920,5 \pm 101,3$ u.a.f. en el control ($n = 69$, $N = 3$) y de $994,9 \pm 172,4$ u.a.f en el mutante AME ($n = 62$, $N = 3$). La Figura 50C muestra el histograma de frecuencia de intensidades medias en ambos tipos celulares en control (izquierda) y mutante AME (derecha), pudiéndose observar la tendencia a una menor señal en las neuronas ChAT negativas (gris) que en las motoneuronas (negro) así como una mayor variabilidad en la expresión de HuD, identificada como un aplanamiento del histograma, en los ratones mutantes AME.

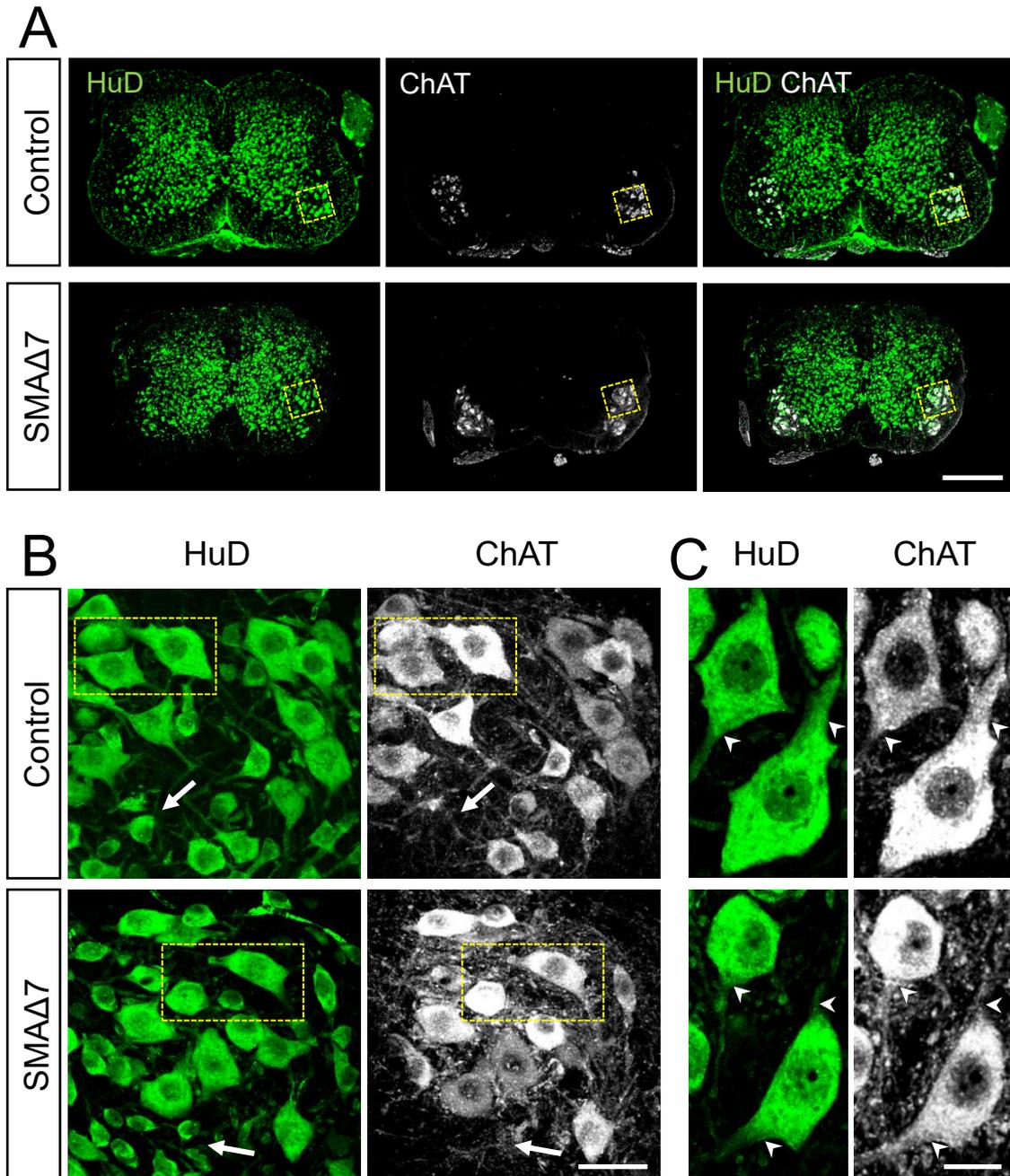


Figura 49. Presencia de HuD en la médula espinal. Proyecciones de máxima intensidad de cortes de médula espinal lumbar procedente de ratones controles y mutantes SMA Δ 7 a P9, tras inmunomarcaje con anticuerpos anti-HuD (verde) y anti-ChAT (blanco). **A.** La señal de HuD se concentra fundamentalmente en los cuerpos celulares de la sustancia gris medular en los dos genotipos. Nótese que tanto las motoneuronas (recuadros) como otras células presentan señal. **B.** Imágenes con mayor resolución de los recuadros en A donde puede identificarse la señal para HuD tanto en células ChAT positivas como negativas (flechas). **C.** Ampliación de los recuadros en B. La señal es más intensa en el citosol y en la porción proximal de las neuritas (puntas de flecha). Barras de escala: 400 μ m (A), 50 μ m (B) y 20 μ m (C).

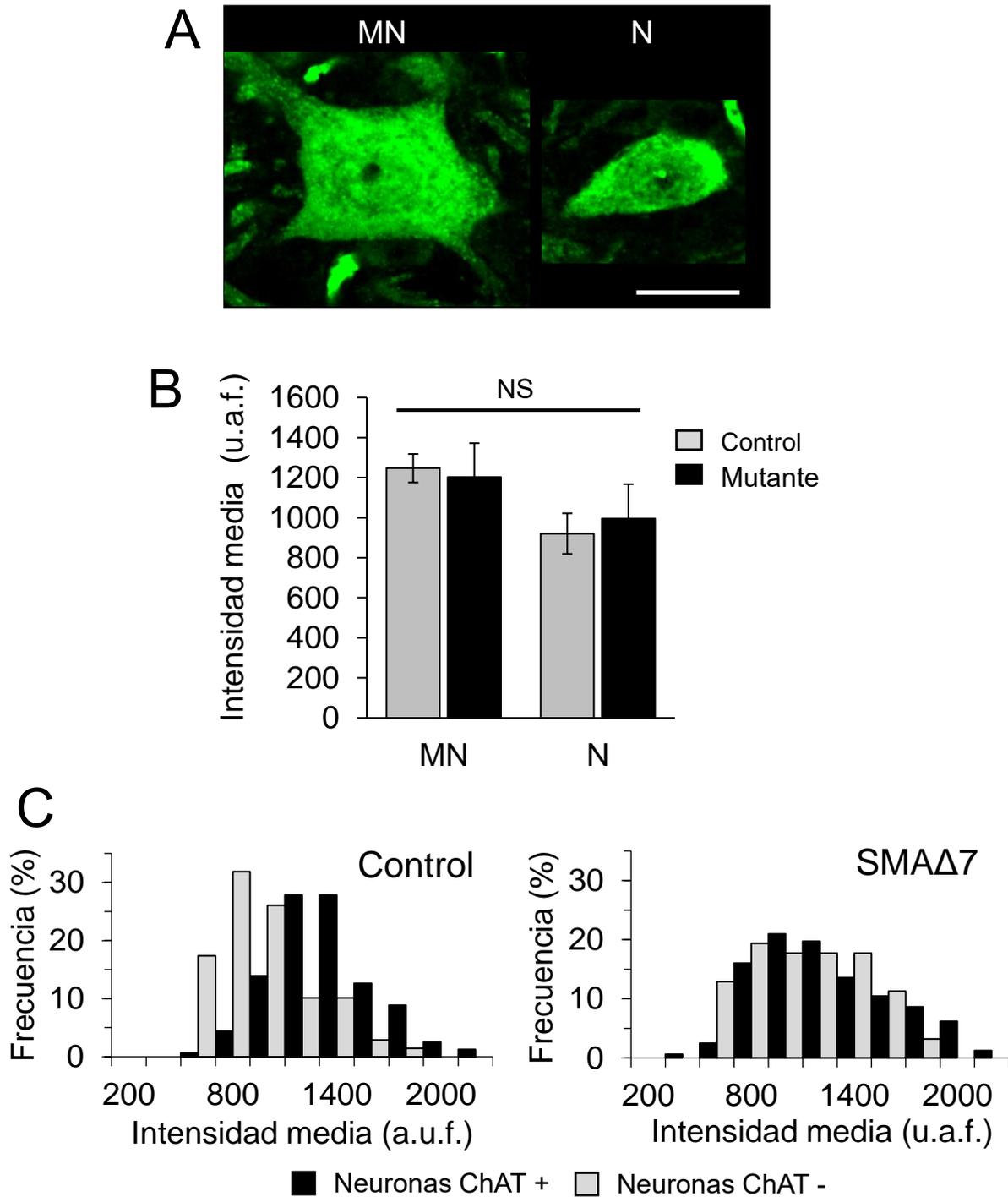


Figura 50. La expresión de HuD en las motoneuronas de la médula espinal no está disminuida en ratones SMA Δ 7 a P9. A. Ejemplos representativos de los 2 tipos de células analizadas: MN y N. Corresponden a proyecciones de máxima intensidad de 3 planos ópticos (1,5 μ m) de células del asta ventral del segmento L1-L2. Barra de escala: 20 μ m. **B.** Análisis comparativo de la intensidad media para HuD en neuronas ChAT positivas (MN) y ChAT negativas (N) en ratones control y mutante AME. **C.** Histograma de frecuencias de intensidad media en neuronas ChAT positivas y negativas en ratones control (izquierda) y mutantes AME (derecha).

A continuación, realizamos marcajes inmunohistoquímicos con el anticuerpo anti-SMN (H195) en cortes de médula espinal en el mismo modelo y a la misma edad, P9. Como se esperaba, pudo identificarse señal procedente de SMN en las motoneuronas espinales (Fig. 51). La señal anti-SMN fue intensa en núcleo y en el soma de las motoneuronas, tanto en ratones controles como mutantes. Los granos intensos que aparecen en el núcleo son compatibles con la localización de SMN en los *gems*.

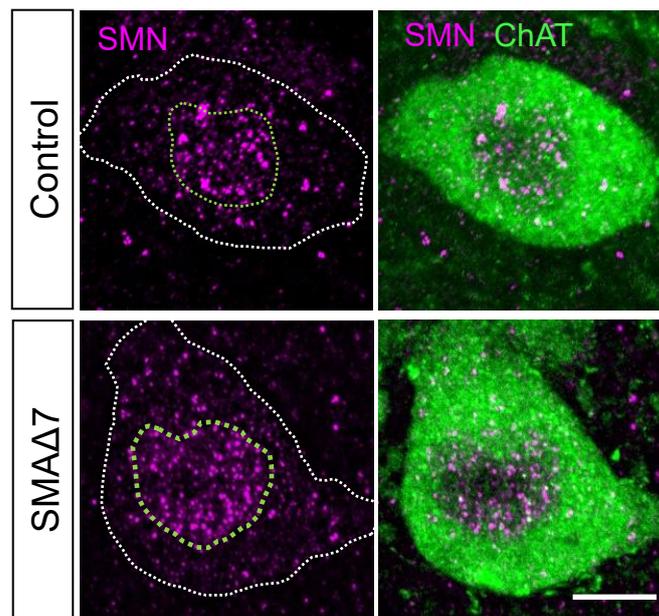


Figure 51. Inmunomarcaje de SMN en el núcleo y soma de motoneuronas espinales en secciones de médula espinal de ratones controles y mutantes $SMN\Delta 7$. Proyecciones de máxima intensidad, sección óptica de 3 μm , de secciones de medula espinal a P9 que muestran el marcaje del anticuerpo anti-SMN (magenta) en el soma y el núcleo de las motoneuronas, identificadas mediante un anticuerpo anti-CHAT (verde). Barra de escala: 10 μm .

Estos resultados sugieren, por un lado, que HuD y SMN se expresan simultáneamente en las motoneuronas espinales durante la etapa de maduración postnatal y, por otro, que los niveles de HuD no se ven afectados en un contexto de bajos niveles de proteína SMN completa en la médula espinal al contrario que se ha postulado en pez cebra (Hao *et al.*, 2017).

Finalmente, puesto que HuD participa en procesos de plasticidad neuronal y sinaptogénesis a nivel de SNC y nuestros resultados no muestran diferencias entre genotipos en su expresión, quisimos confirmar la existencia en nuestro modelo de las alteraciones en los contactos sinápticos de las motoneuronas descritos por otros grupos. Para ello, estudiamos en colaboración con el Dr. Jorge Ojeda el número de entradas sinápticas excitatorias de las neuronas ChAT positivas mediante marcaje inmunohistoquímico del transportador vesicular de glutamato-2 (vGluT2), el cual se encuentra en las sinapsis glutamatérgicas de la medula espinal (Fig. 52). En los mismos segmentos estudiados en los experimentos de HuD, la densidad de entradas sinápticas de las neuronas ChAT positivas fue significativamente menor en los ratones mutantes AME ($p = 0,0154$, test de la t de Student de dos colas), con unos valores medios de $0,059 \pm 0,005 /\mu\text{m}^2$ en los ratones controles ($n = 43$ neuronas; $N = 3$ ratones) y $0,04 \pm 0,003 /\mu\text{m}^2$ en los mutantes ($n = 62$ neuronas; $N = 4$ ratones). Estos resultados sugieren que las alteraciones en los contactos sinápticos a nivel del asta ventral de la médula son independientes de los niveles de HuD a P9.

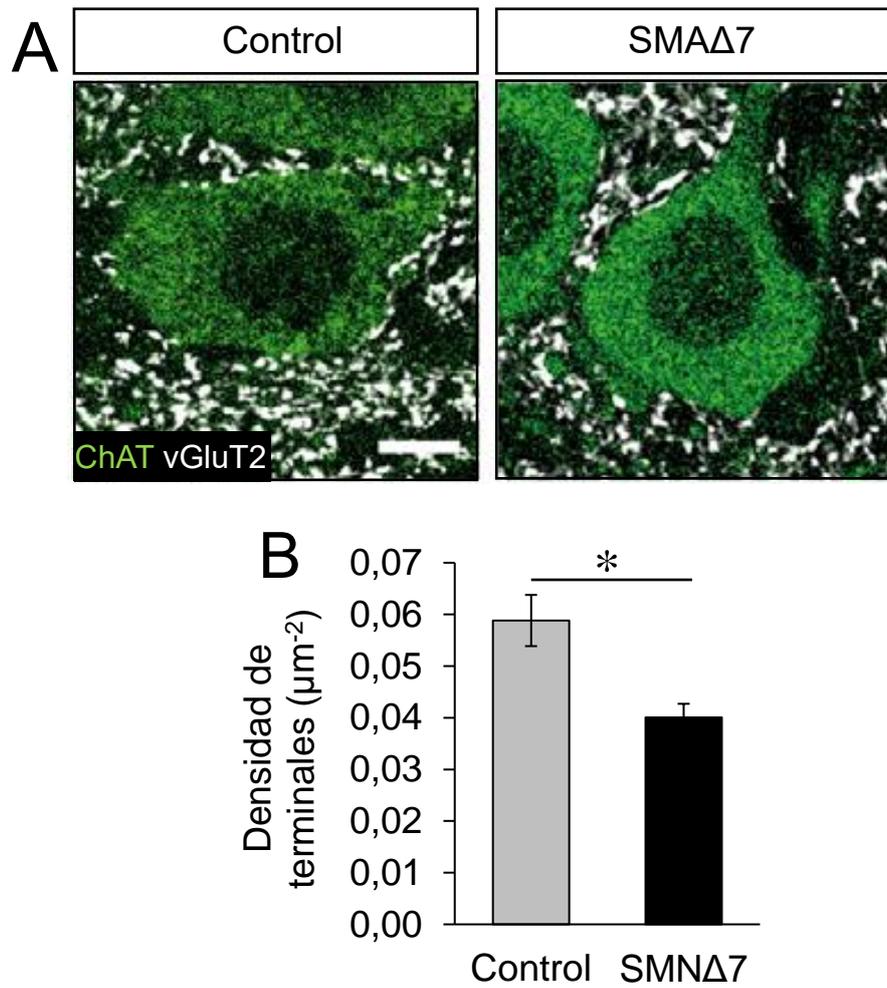


Figura 52. Las entradas sinápticas glutamatérgicas de las neuronas colinérgicas espinales están afectadas en los ratones AME a P9. A. Imágenes representativas de las entradas sinápticas excitatorias (vGluT2; blanco) de las motoneuronas espinales (ChAT; verde) de ratones control y mutante AME. Corresponden a proyecciones de máxima intensidad de 5 planos ópticos (2 μm) del segmento L1-L2. Barra de escala: 10 μm . **B.** Cuantificación de la densidad de entradas sinápticas positivas para vGluT2 por unidad de área del soma. *: $p \leq 0,05$.

1.4. Identificación de ARNm en el axón y la NMJ

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los roles atribuidos a SMN en axones y conos de crecimiento es el de estabilización y translocación de ARNm procedentes del soma (Donlin-Asp *et al.*, 2016, 2017). Por ejemplo, se ha demostrado que en motoneuronas en cultivo SMN participa en la localización axonal del ARNm de β -actina, así como de otros mensajeros, tales como los de GAP43, Cpg15 o ANXA2 (Rossoll *et al.*, 2003; Akten *et al.*, 2011; Fallini *et al.*, 2011, 2014, 2016; Hubers *et al.*, 2011). Estudios recientes, además, han señalado la implicación de SMN en la síntesis local de proteínas en axones motores *in vivo* (Bernabò *et al.*, 2017; Lauria *et al.*, 2020). Por tanto, y teniendo en cuenta que en el presente trabajo hemos descrito una organización de SMN en granos, similar a la descrita en axones y conos de crecimiento en neuronas en cultivo, hipotetizamos que “*In vivo*, SMN participa en la síntesis local de proteínas en axones y terminales presinápticos motores mediante la interacción y estabilización de las moléculas implicadas en la traducción local”. Más concretamente, dado que previamente se ha demostrado la presencia de ARNm para β -actina en motoneuronas en cultivo (Rossoll *et al.*, 2003), proponemos que también está presente *in vivo* en el axón y la NMJ durante el periodo de maduración postnatal temprano.

Para el abordaje de esta hipótesis se realizó una estancia de tres meses en el laboratorio del Prof. Michael Sendtner, en el Institut für Klinische Neurobiologie (Universidad de Würzburg, Alemania). Se llevaron a cabo experimentos de hibridación *in situ* (FISH) mediante sonda de unión a ARNm conjugada al polipéptido digoxigenina (DIG). Esta sonda permite la visualización de ARNm específicos hibridados mediante inmunomarcaje del péptido DIG. Las preparaciones neuromusculares empleadas fueron músculos TVA procedentes de ratones silvestre entre de entre 3 y 6 días de edad (P3-6).

1.4.1. Establecimiento de las condiciones experimentales

Un elemento importante para la realización de la técnica FISH es la digestión proteica, necesaria para que los complejos ARN-proteínas se disocien y el ARN de interés sea accesible para la sonda. Sin embargo, también supone un compromiso si se quiere detectar al mismo tiempo proteínas marcadoras de estructuras, como las proteínas citoesqueléticas

o los receptores de acetilcolina, puesto que la digestión proteica puede dañar estas estas moléculas.

Por este motivo, inicialmente testamos diferentes condiciones experimentales a fin de obtener la digestión enzimática apropiada del tejido. Ensayamos dos concentraciones de proteinasa K: 10 y 2 mg/ml y distintos tiempos de incubación (5-45 minutos). Con 10 mg/ml de proteinasa K obtuvimos una señal punteada intensa, característica del marcaje de ARNm (Fallini *et al.*, 2016; Moradi *et al.*, 2017) tras 5 y 15 minutos de digestión, pero más débil a los 30 minutos y casi inexistente a los 45 minutos (Fig. 53A). También se observaron algunas estructura fluorescentes alargadas, probablemente correspondientes con marcaje inespecífico de los remanentes de las vainas de mielina axonales (Fig. 53A, puntas de flechas), incluso tras 45 minutos de incubación con la enzima. No obstante, el marcador neuronal elegido, la proteína tau, no pudo identificarse adecuadamente en estas condiciones, posiblemente por su alta sensibilidad a la digestión enzimática. Estos resultados mostraron que, si bien una concentración de proteinasa K de 10 mg/ml con tiempos cortos de incubación es adecuada para la visualización del ARNm de β -actina, no permite la correcta visualización de tau.

Por ello, redujimos la concentración de proteinasa K a 2 mg/ml. A esta concentración obtuvimos señal procedente de la sonda de ARN con características similares a las observadas con 10 mg/ml (Fig 53B), incluso tras 45 minutos de incubación con la enzima. Por otro lado, pudimos identificar señal procedente del marcador proteico únicamente tras 5 minutos de incubación con proteinasa K. Con estos datos, establecimos que las condiciones óptimas de digestión enzimática para estos ensayos eran de 5 min de incubación con proteinasa K a una concentración de 2 mg/ml. En la Figura 53C se muestra un ejemplo de las señales obtenidas una vez optimizado el protocolo. Observé el punteado intenso correspondiente a la sonda de ARNm (verde) y la señal de tau correspondiente (rojo).

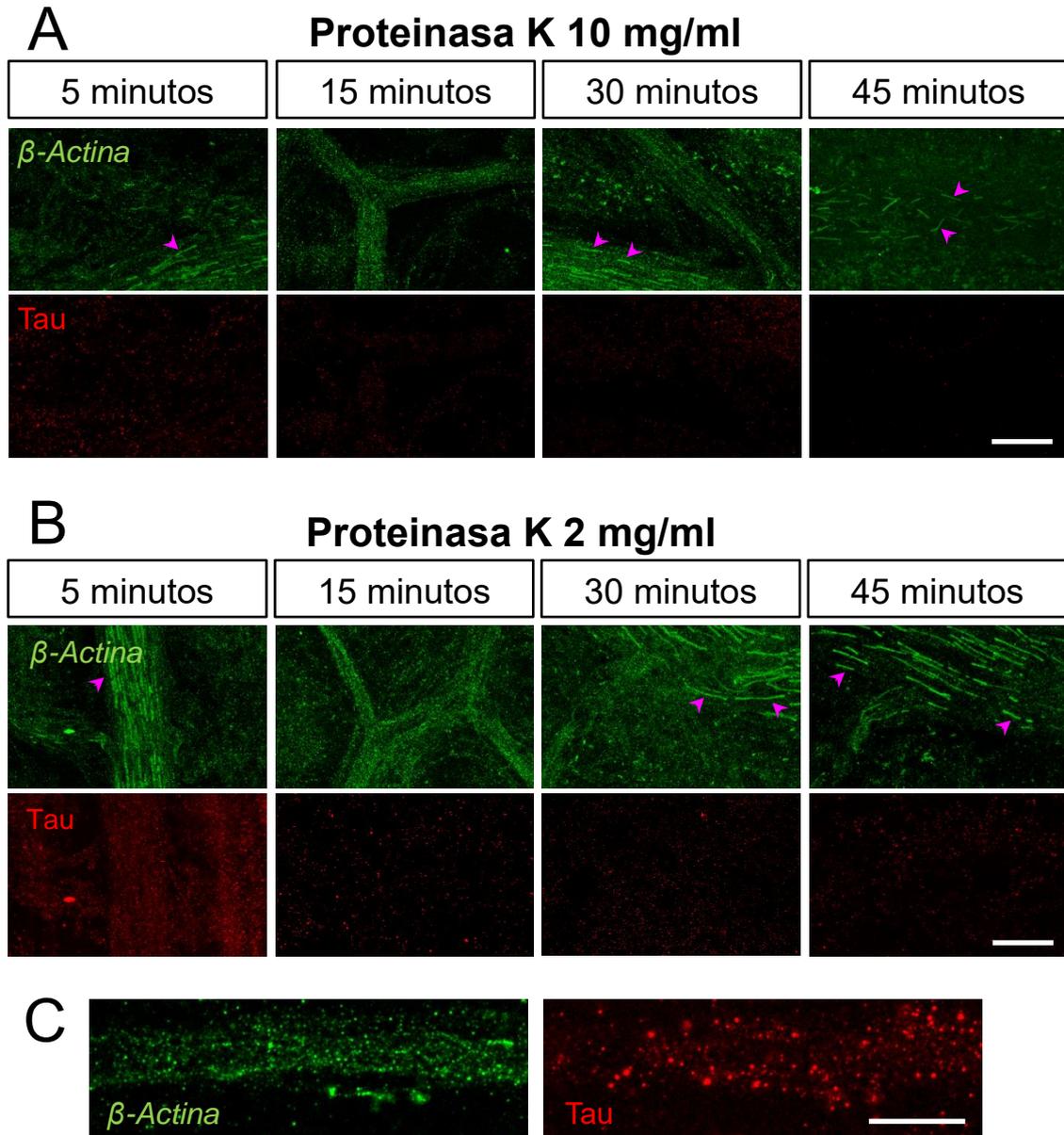


Figura 53. Establecimiento de las condiciones experimentales para la detección del ARNm de β -actina en preparaciones neuromusculares del músculo TVA. A. Tratamiento con 10 mg/ml de proteinasa K durante los periodos de tiempo indicados. Obsérvese que a medida que aumenta el tiempo de incubación (5-15 min) la señal de la sonda-polipéptido DIG que identifica el ARNm de β -actina (β -Actina, verde) aumenta, pero disminuye por degradación del ARN con incubaciones \geq 30 minutos, no observándose señal punteada a los 45 minutos. En las bandas axonales puede observarse también marcaje inespecífico de los remanentes de las vainas de mielina (puntas de flecha). Nótese la ausencia de señal para tau (rojo) en todos tiempos usados. **B.** Tratamiento con 2 mg/ml de proteinasa K durante los periodos de tiempo indicados. En comparación con A, el descenso de la señal correspondiente a β -actina se produce más tardíamente, quedando aun señal tras 45 minutos de incubación con la enzima. Nótese que tiempos de incubación de 5 minutos permiten la visualización de la señal correspondiente a tau. **C.** Detalle de la señal punteada de la sonda en una banda de axones identificada por su inmunoreactividad a tau tras una incubación con 2 mg/ml durante 5 minutos. Barra de calibración: 40 μ m (A-B) y 10 μ m (C).

A continuación, comprobamos la especificidad del anticuerpo anti-DIG mediante un experimento control negativo. Tratamos el tejido con proteinasa K pero en ausencia de la sonda de unión al ARNm de β -actina. En la Figura 54 se muestra que en ausencia de la sonda no se obtuvo señal punteada en el canal verde y sí señal para tau en el canal rojo (flechas), lo que indica que el anticuerpo contra el péptido señal no se une de forma inespecífica a otras moléculas.

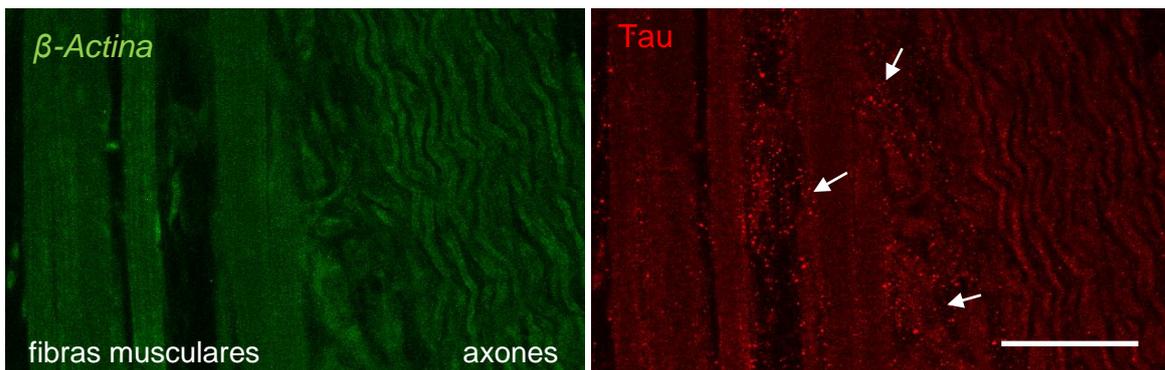


Figura 54. La detección de la sonda por parte del anticuerpo anti-DIG es específica. Proyecciones de máxima intensidad de una preparación neuromuscular visualizada en el canal verde y en el rojo. Se aplicó el protocolo estándar de FISH, pero sin sonda de β -Actina. Nótese que únicamente se obtiene señal de autofluorescencia del tejido en el canal de la sonda (verde) mientras que sí se obtiene señal de tau (rojo) tanto en la banda de axones como en los terminales motores (flechas). Barra de calibración: 40 μ m

1.4.2. El ARNm de β -actina está presente en el axón y en la unión neuromuscular durante la maduración postnatal

Una vez establecidas las condiciones de digestión enzimática y la especificidad del anticuerpo, usamos marcadores del axón y de la NMJ para comprobar la presencia de la señal del ARNm de β -actina en estas estructuras (Fig. 55).

Los axones se identificaron por su morfología y por su inmunorreactividad a un anticuerpo anti-NF-M. La Figura 55A muestra un ejemplo representativo en la que se observa que la señal del ARNm de β -actina coincide con el marcaje de los NF de los axones. Nótese que el aspecto punteado de los NF se debe al efecto de la proteinasa K.

Para la identificación de la NMJ se utilizó BTX-Cy3. Como se aprecia en el ejemplo de la Figura 55B, la señal punteada de la sonda (panel izquierdo) y la señal correspondiente al marcaje de los receptores nicotínicos (panel derecho) son superponibles, indicabando la presencia de este transcrito en la NMJ.

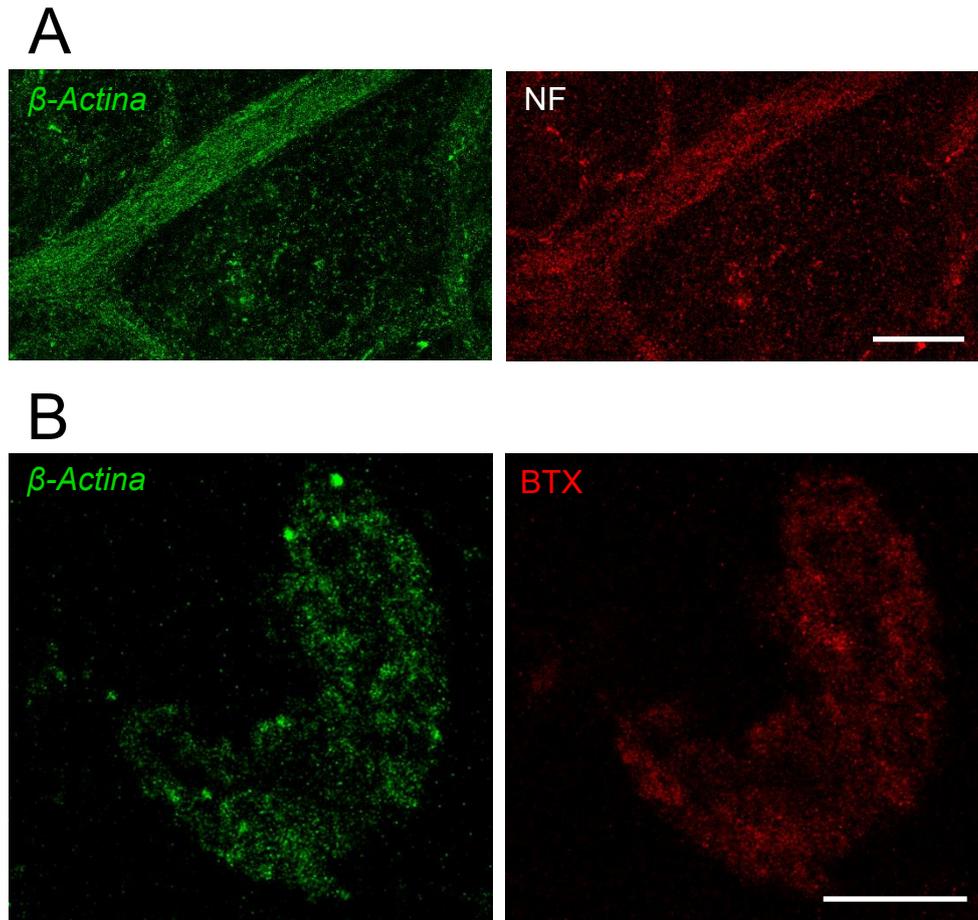


Figura 55. El ARNm de β -Actina está presente en axones periféricos y en la unión neuromuscular. A. Proyección confocal que muestra imagen de un plano único de una banda de axones con señales fluorescentes de β -actina y NF. **B.** imagen de un plano único que muestra un ejemplo de unión neuromuscular con señales fluorescentes de la sonda para β -actina y BTX. Barras de calibración: 40 (A) y 10 (B) μ m.

No obstante, la similitud de las señales de la sonda y de BTX en algunas regiones nos planteó la posibilidad de que pudiera haber cierto grado de cruce de señales entre los canales. Para minimizar esta posibilidad, tomamos las imágenes de forma secuencial en vez de simultánea, aunque ello supuso un mayor tiempo de adquisición y blanqueamiento de la señal. Además, para comprobar la existencia o no de cruce de señales, se realizaron dos controles. Por un lado, se excitó la muestra utilizando solo el láser de 488 nm y se monitorizó la fluorescencia en ambos canales (Fig. 56A, paneles izquierdos). Como se aprecia en el ejemplo de la figura, en ausencia de estimulación a 561 nm se obtuvo señal intensa para la sonda, lo que era esperable por el espectro de excitación de AF488, pero no en el canal de la BTX, lo que indica que la emisión del canal verde no pasa al otro canal y que su emisión no excitó a Cy3. Por otro, cuando se usaron ambos láseres no se observó que la intensidad de la señal de la sonda se modificara de forma importante (Fig. 56A, paneles derechos), lo que indica que la señal procedente de Cy3 no cruzaba al canal verde a pesar de una buena intensidad de señal en el canal de Cy3. Estos resultados indican que, a las intensidades de láseres empleadas, la señal obtenida en cada canal es específica del fluoróforo correspondiente y que el cruce de canales, de producirse, es mínimo.

Finalmente, para para confirmar los resultados del experimento anterior, se empleó un anticuerpo primario anti-tau con Cy3 como secundario en vez de BTX-Cy3 (Fig 56B). El patrón de señal de tau fue completamente distinto al de BTX, presentando un patrón granular. Sin embargo, la señal procedente de la sonda mantuvo el mismo patrón.

En su conjunto, estos datos muestran por primera vez la presencia del ARNm de β -actina terminales motores durante el periodo de maduración postnatal del circuito motor.

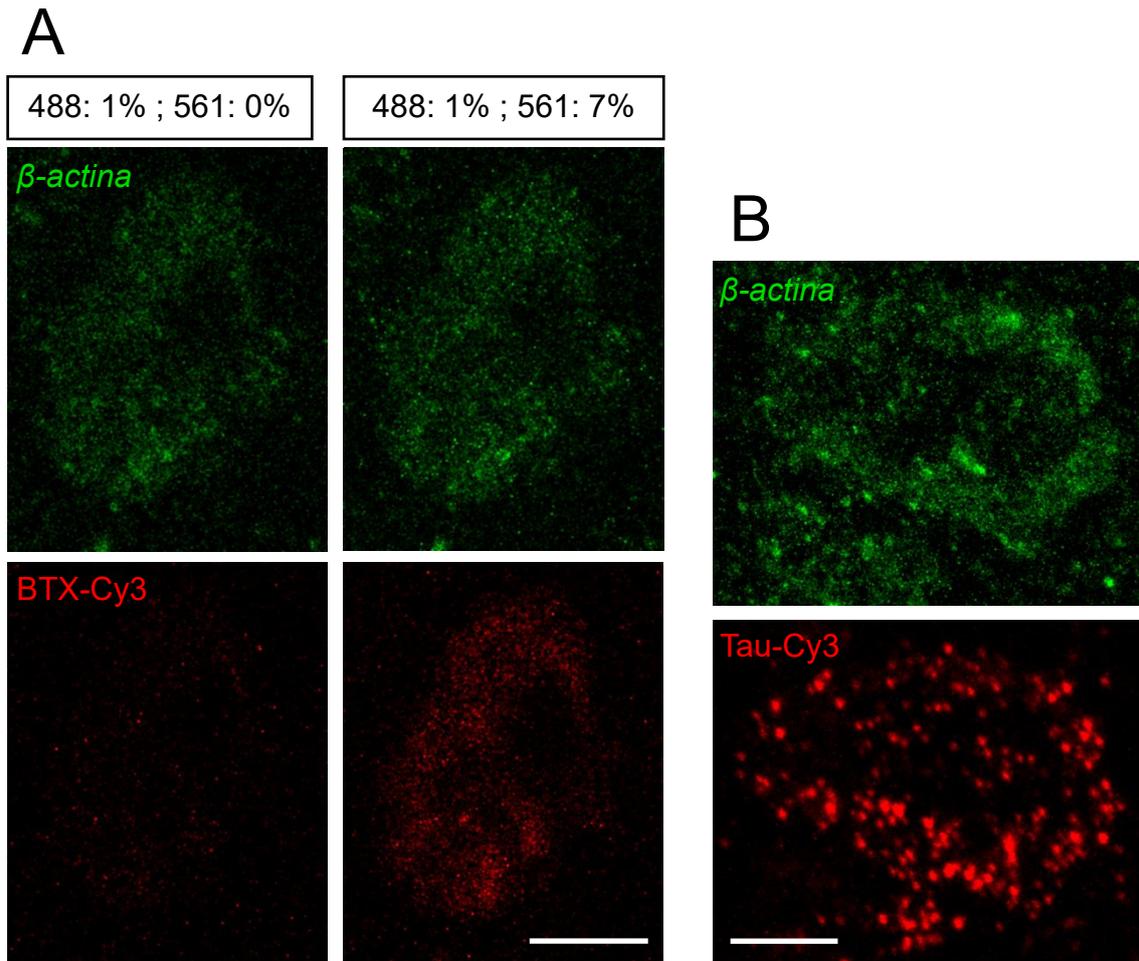


Figura 56. La señal es específica de la sonda de β -Actina. **A.** imágenes de plano único que muestran que el cruce de señal entre el canal de la BTX y el de β -actina es insignificante. Si el tejido se excita exclusivamente con 488 nm (paneles izquierdos) no se observa señal en el canal Cy3. Cuando se excita junto con 561 nm (paneles derechos) no se observa un cambio apreciable en la intensidad de la señal de β -actina. **B.** Proyecciones de máxima intensidad que muestra la distribución de señales fluorescentes de β -actina y tau en ausencia de BTX-Cy3. Barras de escala: 5 μ m

1.5. Los terminales presinápticos motores contienen ribosomas y polirribosomas durante el periodo de maduración postnatal

SMN, además de actuar como chaperona molecular en el ensamblaje de las snRNP del espliceosoma, interacciona con proteínas que unen ARNm (RBP) facilitando el ensamblaje y transporte de los gránulos mRNP desde el soma a las neuritas y axón (Price *et al.*, 2018). Así mismo, estudios recientes han mostrado que SMN se une de forma específica a un conjunto de ribosomas regulando la traducción de un grupo amplio de ARNm (Lauria *et al.*, 2020). Dada la presencia de SMN en axones y terminales motores, hipotetizamos que los granos de SMN identificados en nuestro trabajo participan en el transporte de ARNm y RBP desde el soma hasta el terminal presináptico dónde tiene lugar la síntesis local de proteínas durante la fase de maduración sináptica. No obstante, hasta la fecha, existe pocos datos sobre de la presencia de elementos de la maquinaria de síntesis proteica en los terminales presinápticos motores. Por ello, investigamos la presencia de ribosomas y polirribosomas en este compartimento mediante microscopía electrónica de transmisión, en colaboración con los profesores Calderó (Universidad de Lleida) y Armengol (Universidad Pablo de Olavide). Estos experimentos fueron realizados en el servicio de microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

La Figura 57 muestra ejemplos representativos de NMJ del músculo *Tibialis anterior* procedente de ratones control y mutante SMA Δ 7, a P14. En ambos genotipos se aprecian abundantes ribosomas en el terminal presináptico, así como algunos polirribosomas (Fig. 57, puntas de flechas y recuadros). Estos resultados, junto con la identificación del ARNm de β -actina, demuestran que los terminales presinápticos motores controles y AME contienen la maquinaria molecular necesaria para la síntesis de proteínas. Además, la presencia de polirribosomas sugiere fuertemente la existencia de traducción local activa durante la maduración postnatal de la NMJ.

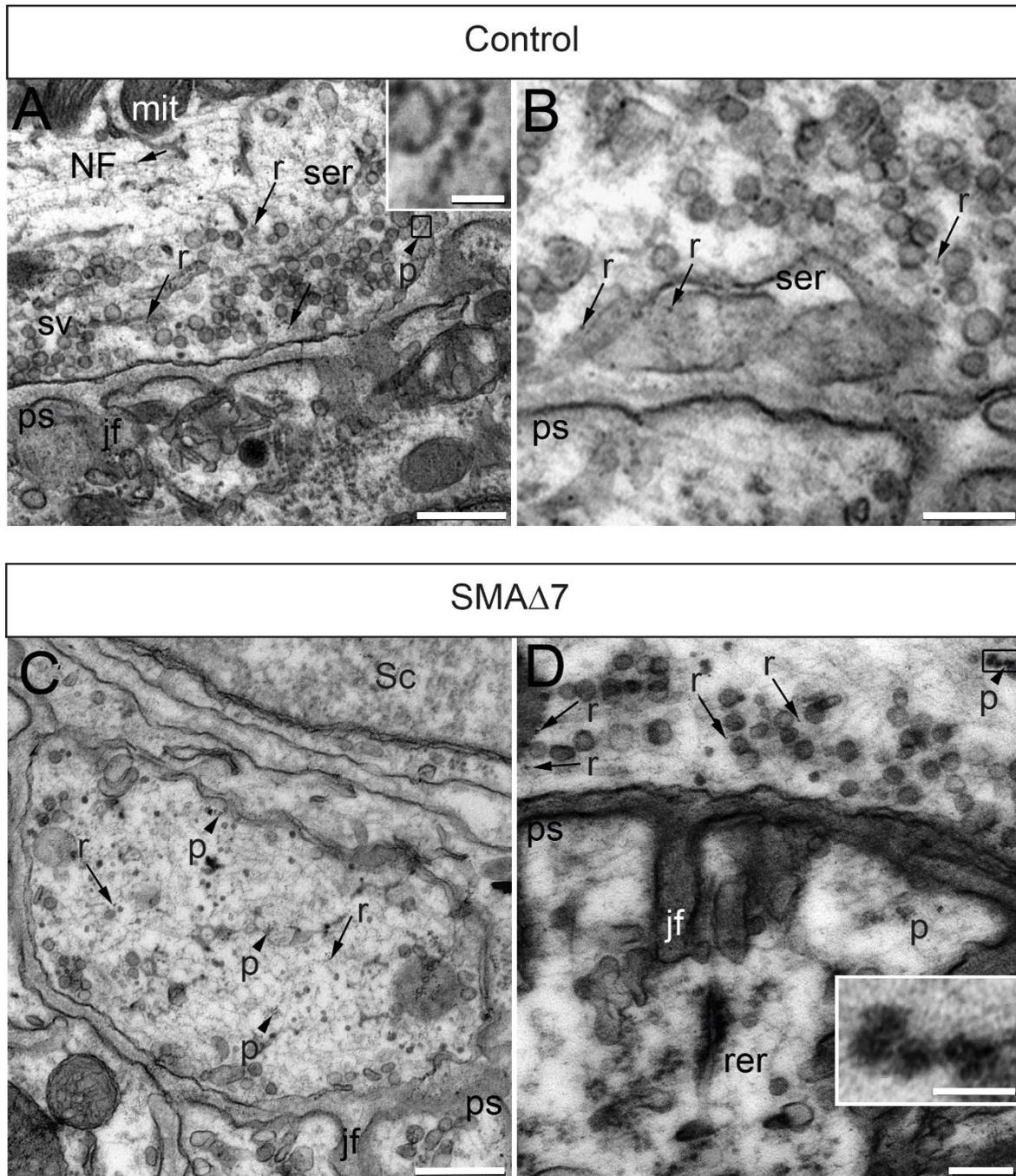


Figura 57. Los terminales presinápticos motores controles y mutantes SMA Δ 7 contienen ribosomas y polirribosomas. Imágenes representativas tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión uniones neuromusculares del músculo TA de ratones control (A-B) y mutante SMA Δ 7 (C-D) a P14. En el citoplasma del terminal presináptico, se marcaron las vesículas sinápticas (sv), los neurofilamentos (NF), las mitocondrias (mit) y el retículo endoplásmico liso (ser). Dispersos a través del citoplasma del terminal presináptico hay numerosos ribosomas independientes (r) (flechas) y, menos abundantes, polirribosomas (p) (puntas de flecha y recuadro de A y D). jf: pliegues de la unión; ps: elemento postsináptico; rer: retículo endoplásmico rugoso; Sc: célula de Schwann. Barras de calibración: 500 nm (A y C), 200 nm (B y D) y 50 nm (insertos de A y D).

2. Afectación de la endocitosis y de las mitocondrias presinápticas en la AME

Las mitocondrias desempeñan un papel importante en la regulación de la neurotransmisión y las necesidades metabólicas en las sinapsis. Por un lado, actúa como un sumidero del Ca^{2+} libre citoplasmático (Jung *et al.*, 2020), regulando, por tanto, indirectamente el proceso de neurotransmisión y evitando procesos neurotóxicos secundarios a los altos niveles citoplasmáticos de este ion. Además, la mitocondria participa en el acoplamiento entre la producción y la demanda energética celular (MacAskill *et al.*, 2010; Rueda *et al.*, 2016), especialmente importante en las neuronas debido al aumento de la demanda de ATP durante la actividad eléctrica.

Distintos grupos han investigado el estado de las mitocondrias en el contexto de la AME, determinando que la estructura y el metabolismo mitocondrial están alterados (Kariya *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2009; Torres-Benito *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2016). En las cultivos primarios de motoneuronas AME, las mitocondrias son menos abundantes que en el control (Martinez *et al.*, 2012) y tienen una longitud reducida (Miller *et al.*, 2016). Además, en las motoneuronas en cultivo deficientes en SMN los genes relacionados con la bioenergética mitocondrial están desregulados, el balance respiratorio y la síntesis de ATP están reducidos y el nivel de estrés oxidativo aumentado (Miller *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta donde sabemos, no existe información directa en AME sobre la capacidad de las mitocondrias sinápticas para tamponar el Ca^{2+} durante la actividad eléctrica, un mecanismo esencial para sintetizar ATP bajo demanda.

En nuestro laboratorio hemos medido los transientes de Ca^{2+} en las mitocondrias presinápticas de la NMJ y monitorizado el proceso de exocitosis y endocitosis de forma dinámica *ex vivo*, en ratones controles y modelo de AME (Lopez-Manzaneda *et al.*, 2021). Estos experimentos demostraron una reducción del Ca^{2+} libre mitocondrial en los ratones AME durante la actividad eléctrica. En el presente estudio hemos investigado la posible participación del potencial de membrana mitocondrial en la alteración de la homeostasis mitocondrial del Ca^{2+} , así como la contribución de la glucólisis versus la fosforilación oxidativa en la obtención de energía durante la neurotransmisión.

2.1. Caracterización funcional del modelo animal

El modelo animal AME empleado para la caracterización funcional del terminal presináptico motor fue el modelo murino taiwanés. En primer lugar, realizamos la caracterización fenotípica básica de la colonia. La curva de peso corporal mostró una diferencia significativa entre los ratones controles y mutantes a partir de P4. La diferencia aumentó con la edad ya que en los ratones AME el peso medio se mantuvo casi constante cerca de los 2 g entre P3 y P14, mientras que los ratones controles aumentó en promedio 0.5 g/ día (Fig. 58A).

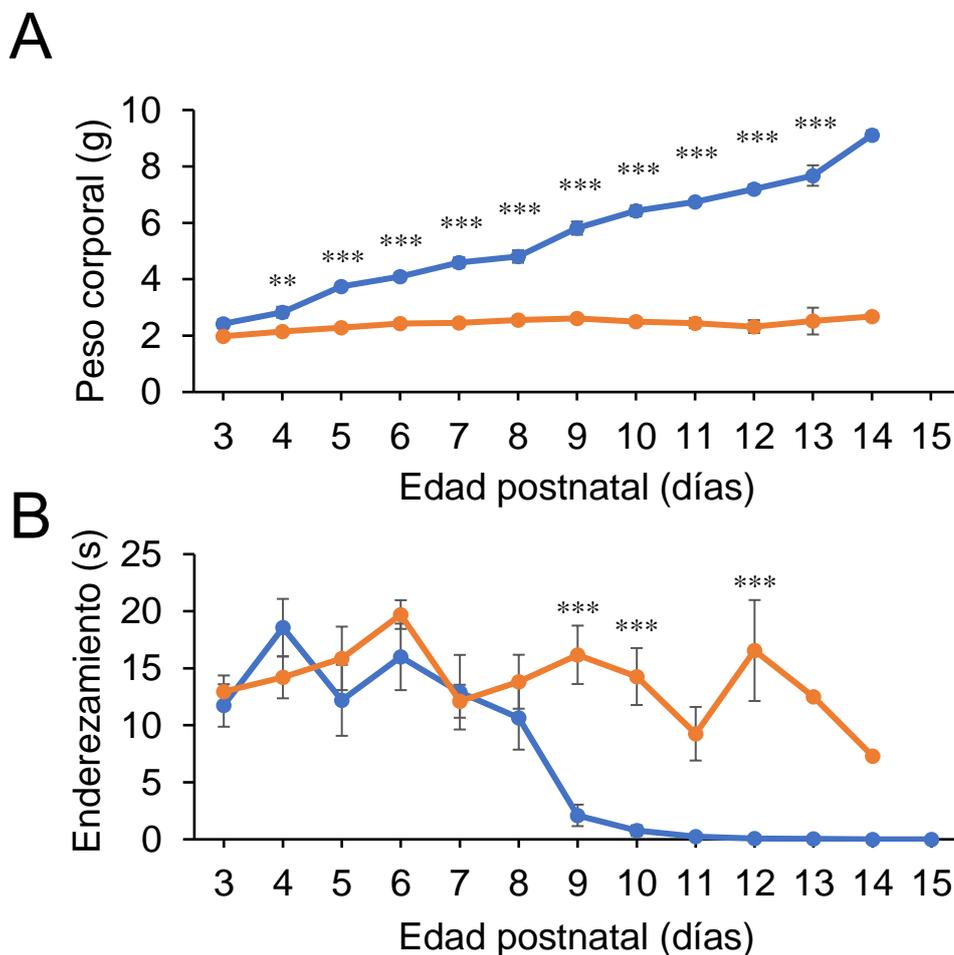


Figura 58. Los ratones mutantes del modelo Taiwanés presentan un fenotipo alterado. Comparación de los principales parámetros fenotípicos de los ratones controles (azul; n = 10, N = 3) y mutantes AME (naranja; n = 17, N = 3). **A.** Evolución de la curva de peso corporal. **B.** Comparación de la curva de tiempos de enderezamiento. **: p < 0,005; ***: p < 0,0005; Test de Bonferroni.

El estudio de la función motora se realizó mediante el análisis del reflejo de enderezamiento (ver *Material y Métodos*). Los valores obtenidos fueron similares en controles y mutantes hasta P8, con un rango comprendido entre 10 y 20 s (Fig. 58B). Sin embargo, a partir de P9 se produjo un descenso brusco en los controles, enderezándose casi al instante a partir de P10 en la mayoría de los casos. Los mutantes, sin embargo, mantuvieron la tendencia observada durante los primeros 8 días durante todo el tiempo que duró el ensayo. Así mismo, mientras que la variabilidad en los tiempos entre ratones se mantuvo alta en los mutantes, en los controles disminuyó sustancialmente durante la segunda semana de vida.

Finalmente, estudiamos la supervivencia de los ratones mutantes AME desde el nacimiento. La mortalidad ocurrió entre P5 y P15, con la mediana situada en P10 (Fig. 59A), siendo la edad media de supervivencia de $9,9 \pm 0,46$ días ($n=31$ ratones, $N=5$ camadas). Sin embargo, observamos cierta variabilidad entre camadas (Fig. 59B), por ejemplo, en una de ellas se observó un desplazamiento de la curva a la derecha sobreviviendo todos los ratones mutantes hasta P12, edad en la que en el resto de las camadas el 60-100% de los ratones habían ya fallecido.

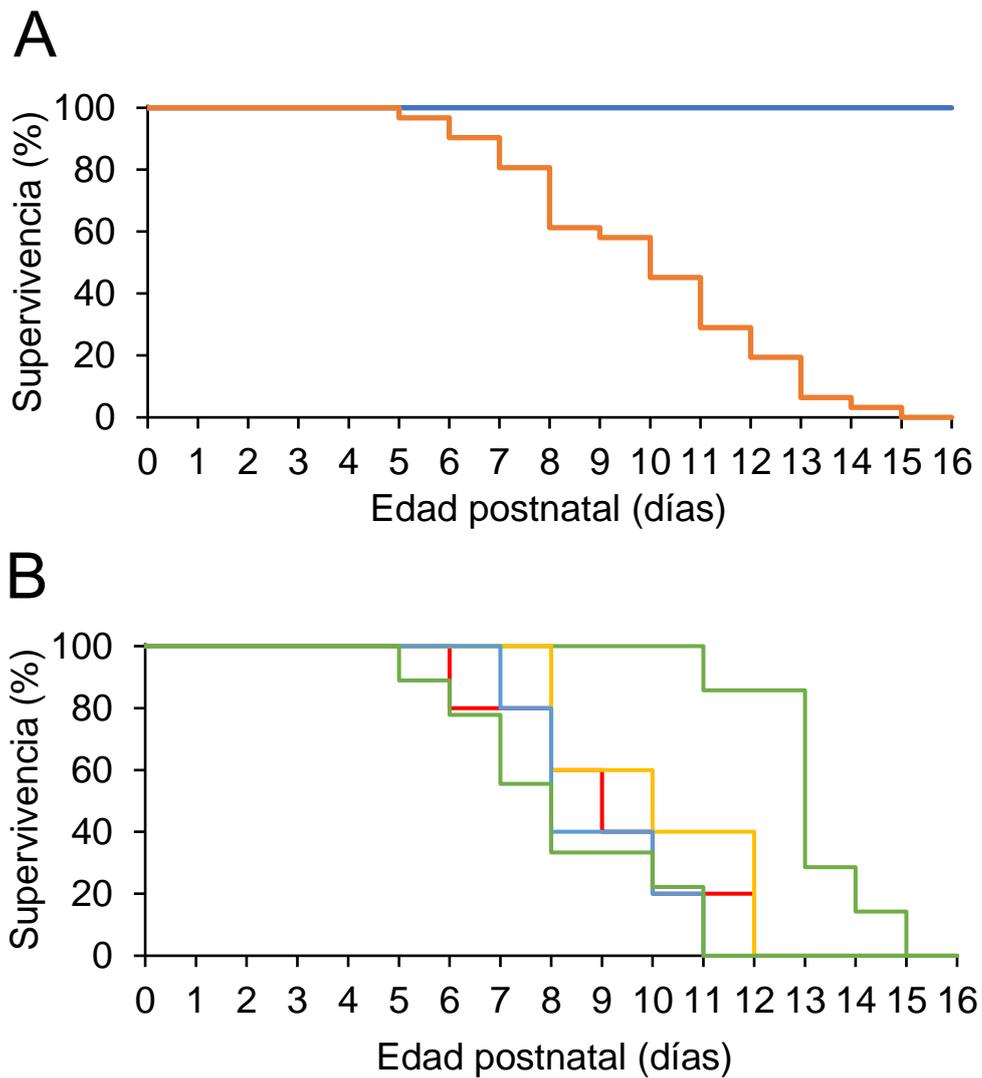


Figura 59. Los ratones mutantes mueren en las dos primeras semanas de vida. A. Curvas Kaplan-Meier comparando la supervivencia en cada genotipo. Controles (azules; $n = 26$; $N = 5$), mutantes AME (naranja; $n = 31$, $N = 5$). **B.** Supervivencia en cada una de las camadas mutantes analizadas.

2.2. La liberación de neurotransmisores está alterada en los ratones deficientes en SMN del modelo Taiwanés

Estudios previos han caracterizado *ex vivo* la función sináptica en la NMJ en el modelo SMN Δ 7, observando defectos importantes en la liberación de neurotransmisor (Kong *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010; Tejero, 2016; Tejero *et al.*, 2016). Sin embargo, aún existe poca información sobre el grado de afectación funcional del terminal motor en el modelo taiwanés. Por ello, realizamos registros electrofisiológicos mediante electrodos intracelulares en preparaciones *ex vivo* del músculo TVA de ratones control y mutantes AME con el objetivo de conocer mejor las características de la neurotransmisión. Estos experimentos se realizaron con ratones en edades comprendidas entre P7 y P10.

En la Figura 60 se muestran los principales parámetros de liberación obtenidos con baja frecuencia de estimulación (0,5 Hz). El análisis de la amplitud del potencial de placa (EPP) reveló valores medios similares en ambos genotipos ($27,53 \pm 2,57$ mV en control; $n = 50$ fibras, $N = 7$ ratones y $29,11 \pm 3,54$ mV en mutantes; $n = 53$ fibras, $N = 8$ ratones; $p = 0,73$; prueba de la t de Student de dos colas). Sin embargo, la cinética de la respuesta fue más lenta en los ratones SMA, tanto la fase de subida del EPP ($0,92 \pm 0,09$ ms en control; $n = 26$ fibras, $N = 4$ ratones y $1,07 \pm 0,08$ ms en mutantes; $n = 19$ fibras, $N = 3$ ratones; $p = 0,0337$; prueba de la U de Mann-Whitney de dos colas), como la cinética de relajación de la respuesta representada por la constante de tiempo τ ($3,5 \pm 0,19$ s en control y $4,81 \pm 0,59$ s en mutantes; $p = 0,0388$; prueba de la U de Mann-Whitney de dos colas). Estos cambios suponen un enlentecimiento del 15,59 y 37,5 %, respectivamente, atribuible, en principio, al retraso en la maduración de los terminales, al igual que ocurre en el modelo SMA Δ 7 (Ruiz *et al.*, 2010)

La frecuencia de potenciales de placa en miniatura (mEPP) fue similar en ambos genotipos ($p = 0,0541$; prueba de la U de Mann-Whitney de dos colas), con valores medios de $0,1 \pm 0,03$ s⁻¹ en ratones controles ($n = 50$ fibras, $N = 7$ ratones) y $0,06 \pm 0,01$ s⁻¹ en mutantes ($n = 53$ fibras, $N = 8$ ratones). Los ratones deficientes en SMN mostraron un incremento del ~50% en la amplitud de los minis ($p = 0,0048$; prueba de la t de Student de dos colas), con un valor medio en los control es de $1,83 \pm 0,12$ mV ($n = 50$ fibras, $N = 7$ ratones) y de $2,74 \pm 0,23$ mV en los mutantes AME ($n = 53$ fibras, $N = 8$ ratones).

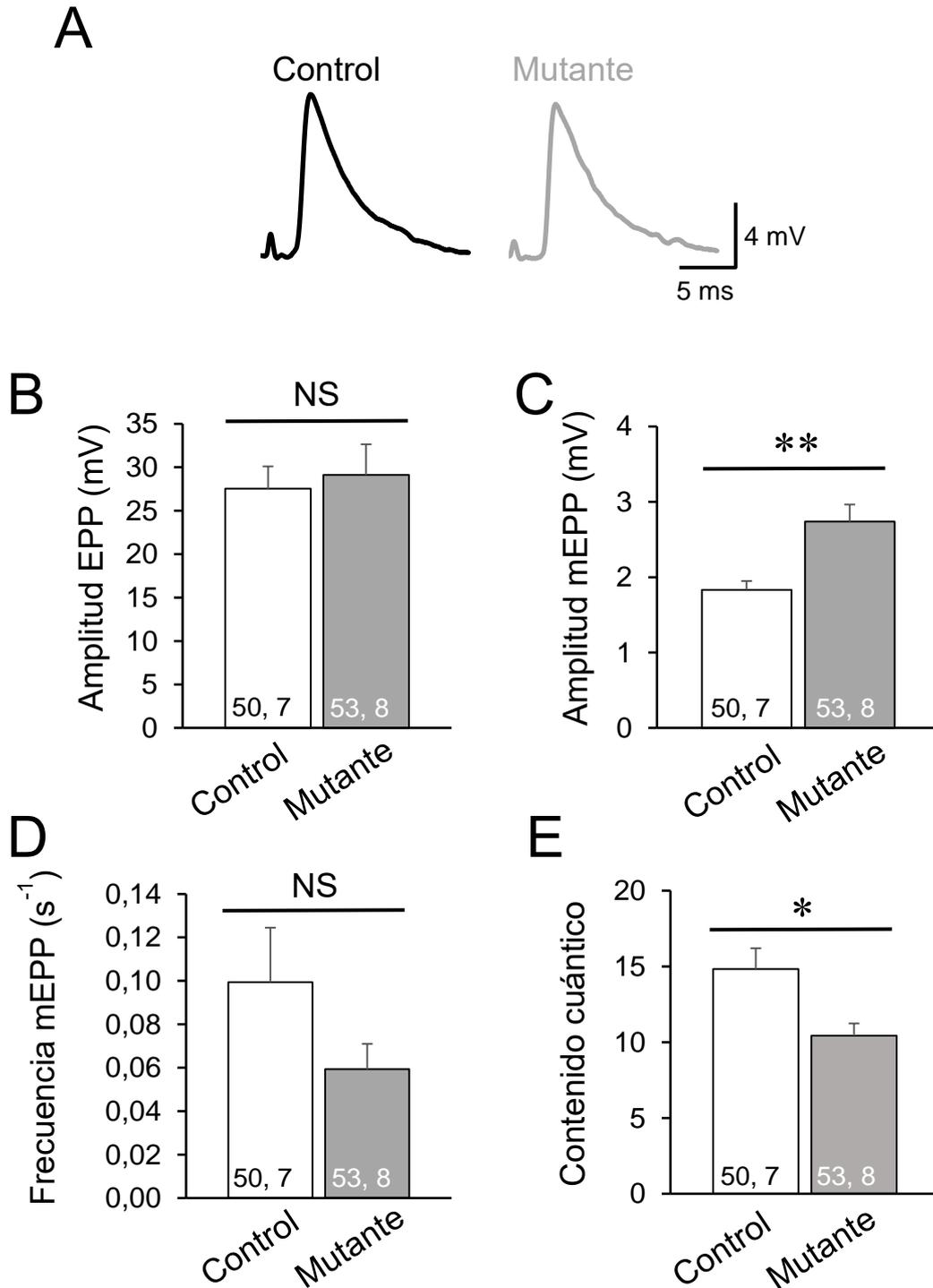


Figura 60. Los terminales AME del modelo taiwanés presentan una reducción de la liberación evocada entre P7-10. A. Trazos representativos de EPP registrados a baja frecuencia de estimulación (0,5 Hz) en fibras controles y mutante AME (negro y gris, respectivamente). **B-E.** Comparación de los valores medios de amplitud de los potenciales evocados (B) y en miniatura (C), frecuencia de potenciales en miniatura (D) y contenido cuántico (E). Los números en las barras indican el número de fibras musculares y de ratones analizados, respectivamente. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$

A continuación, se analizó el contenido cuántico (QC) en ambos genotipos. Este parámetro estima el número de vesículas sinápticas que se exocitan por cada potencial de acción y se calculó por el método directo, es decir, mediante el cociente entre el valor medio del EPP y el valor medio del mEPP. El análisis reveló una reducción significativa en los ratones mutantes de un 29,69 %, con unos valores medios de $14,82 \pm 1,37$ y $10,42 \pm 0,81$ en controles y mutantes, respectivamente ($p = 0,0138$; prueba de la t de Student de dos colas).

Los resultados del estudio electrofisiológico mediante trenes de estimulación de 80 PA a alta frecuencia (20 Hz) para este músculo se muestran en la Figura 61. Con este patrón de estimulación, la amplitud de los EPP aumentó durante los primeros 2-5 estímulos en ambos genotipos, característica de un fenómeno de facilitación, y se reflejó en el contenido cuántico (Fig. 61A). Aunque el aumento o facilitación se produjo en ambos genotipos, fue mayor proporcionalmente en los mutantes ($p = 0,0044$, prueba de la t de Student), con una liberación máxima media equivalente al $133,1 \pm 8,42$ % de la primera respuesta ($n = 13$ fibras, $N = 5$ ratones), mientras que en los controles correspondía con un $109,6 \pm 2,67$ % ($n = 19$ fibras, $N = 5$ ratones). Sin embargo, la liberación máxima media fue superior en los terminales controles, alcanzando valores de $30,37 \pm 5,06$ cuantos, en contraposición con los $17,32 \pm 1,89$ cuantos de los mutantes ($p = 0,007$, prueba de la t de Student de dos colas). Además, la liberación máxima apareció más tardíamente en los terminales AME ($p = 0,0092$, prueba de la U de Mann-Whitney), requiriendo más estimulaciones (Fig. 61B).

En ambos genotipos, tras la facilitación inicial se produjo una disminución progresiva en la liberación hasta alcanzarse un valor estable o meseta (depresión a corto plazo, STD). El análisis de la STD (Fig. 61C) reveló una mayor depresión relativa en los terminales controles que en los mutantes ($p = 0,0084$, prueba de la t de Student de dos colas), con unos valores medios de un $41,92 \pm 2,26$ %, y $21,93 \pm 7,95$ % respectivamente. Sin embargo, los terminales motores controles mantuvieron unos niveles de liberación superior al de los mutantes durante la STD, con valores medios de contenido cuántico en las últimas 40 respuestas de $13,8 \pm 1,06$ y $9,64 \pm 1,05$, respectivamente. Esta diferencia en la liberación se vio reflejada en la liberación acumulada tras un tren de 80 potenciales de acción (Fig. 61D), siendo significativamente mayor en los terminales controles que en

los mutantes (controles: $1170 \pm 89,56$, $n = 19$, $N = 5$; mutantes: $822,52 \pm 85,73$, $n = 13$, $N = 5$; $p = 0,0118$, prueba de la t de Student de dos colas)

Estos datos indican que a las edades analizadas y en condiciones fisiológicas, existe una alteración en la transmisión neuromuscular en los ratones mutantes del modelo Taiwanés.

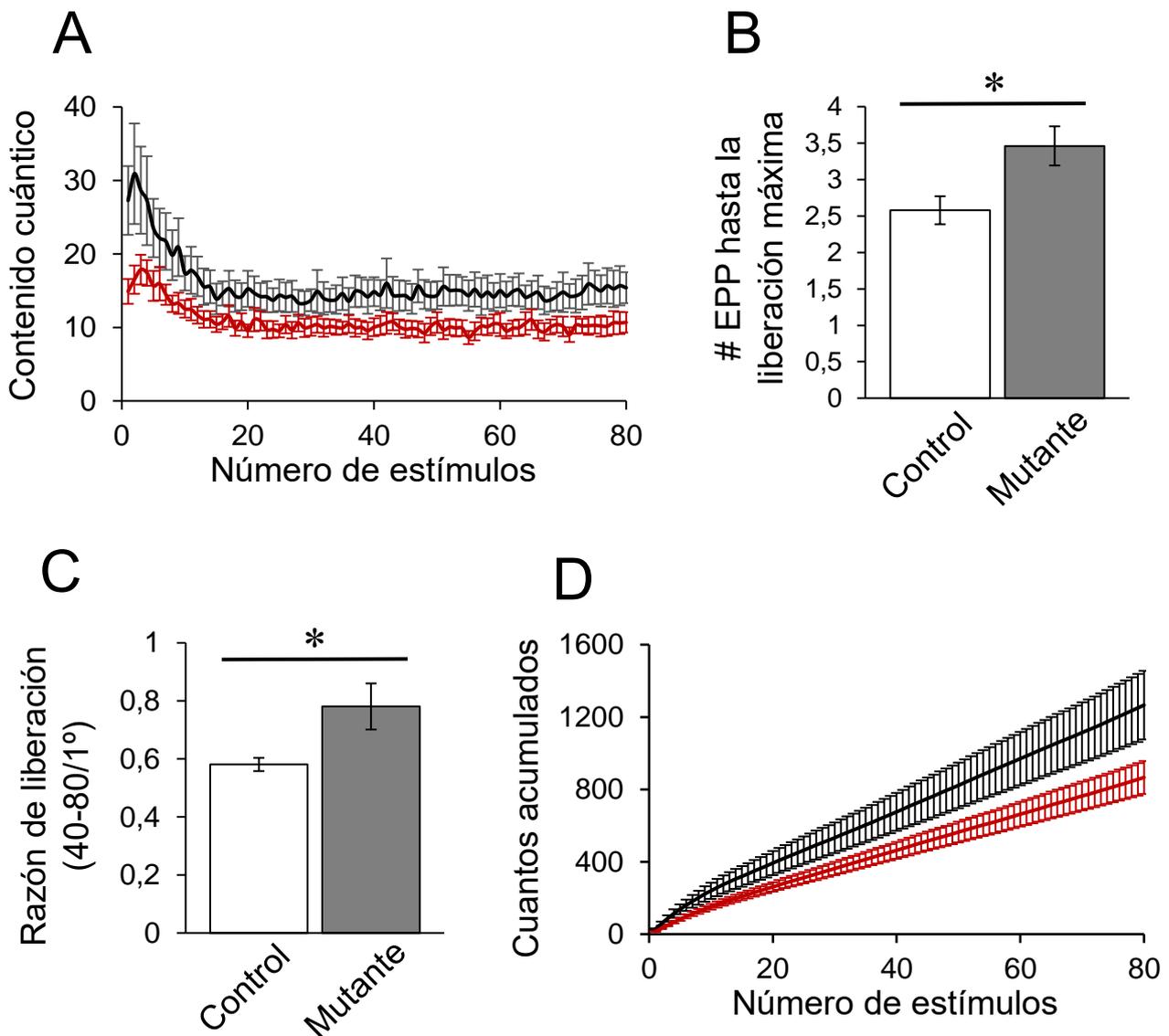


Figura 61. Los terminales AME del modelo taiwanés estimulados a alta frecuencia presentan una reducción de la liberación evocada. Tras la aplicación de trenes de estimulación de 80 PA a 20 Hz, se compararon los parámetros de liberación sináptica en ratones control ($n = 19$ fibras, $N = 5$ ratones) y mutante ($n = 13$ fibras, $N = 5$ ratones). Las barras de error representan los SEM. **A.** Contenido cuántico medio en terminales controles (negro) y mutantes (rojo). **B.** Número medio de EPP necesarios para conseguir el pico de liberación en terminales controles y mutantes. **C.** Comparación de la razón de liberación entre terminales controles y mutantes. **D.** Comparación de la liberación acumulada en terminales controles (negro) y mutantes (rojo). *: $p < 0,05$

2.3. El ciclo vesicular exo-endocítico está alterado en los ratones deficientes en SMN del modelo Taiwanés

Distintos trabajos han descrito anomalías en ciclo vesicular exo-endocítico en modelos de AME. Sin embargo, existe poca información sobre la alteración en el ciclo de las vesículas sinápticas en los terminales nerviosos motores. En nuestro laboratorio, hemos cruzado la línea taiwanesa con una línea de ratones propia que expresa de forma heteróloga una proteína de la membrana vesicular, la sinaptofisina, fusionada con una pHluorina, una GFP modificada cuya fluorescencia depende del pH, a la que hemos denominado línea SypHy (Cano, 2014; Lopez-Manzaneda *et al.*, 2021). La pHluorina está apagada al pH ácido intravesicular y encendida al pH alcalino del medio extracelular, lo que ocurre cuando la vesícula se fusiona a la membrana celular. La fluorescencia se apaga nuevamente tras la endocitosis y reacidificación por protonación de la vesícula (Miesenböck *et al.*, 1998; Sankaranarayanan *et al.*, 2000; Tabares *et al.*, 2007; López-Manzaneda *et al.*, 2021). Por tanto, la señal obtenida refleja el equilibrio entre exocitosis y endocitosis.

La Figura 62A muestra un ejemplo de un terminal nervioso motor que expresa SypHy (imagen de la izquierda) y su lado postsináptico (imagen de la derecha), teñido después de agregar BTX-Rodamina a la cámara.

Como se ha mostrado anteriormente, la exocitosis está disminuida en el modelo AME (Fig. 60 y 61), por lo que se podría esperar una respuesta SypHy más pequeña en los terminales mutantes que en los controles, a menos que exista un defecto adicional en el proceso de endocitosis-reacidificación. La Figura 62B muestra ejemplos típicos de fluorescencia SypHy antes (basal) y al final de un tren de 200 AP a 20 Hz, en terminales control y AME. La fluorescencia basal de los terminales en reposo fue muy similar en ambos genotipos; sin embargo, la amplitud del incremento de fluorescencia (ΔF) durante el tren de estimulación fue aproximadamente un 20% mayor en los terminales AME (722.4 ± 52 u.a.f.: n, N: 45, 6) que en los controles (602.3 ± 60.6 u.a.f.: n, N: 53, 9) ($p < 0,0047$, prueba U de Mann-Whitney), lo que indica una menor endocitosis-reacidificación durante el tren de estimulación (Fig. 62C).

La normalización de las respuestas a sus respectivas amplitudes máximas nos permitió comparar el tiempo de caída de la fluorescencia después del tren de estimulación

en ambos genotipos. Este parámetro fue similar en los terminales controles (τ : 9.9 ± 0.7 s; n, N: 53, 9) y AME (τ : 10.6 ± 0.7 s; n, N: 45, 6), ($p = 0,3$, prueba U de Mann-Whitney).

Estos resultados, por un lado, validan el deterioro de la endocitosis determinado por otros métodos en células y terminales nerviosos deficientes en SMN (Dimitriadi *et al.*, 2016; Hosseinibarkooie *et al.*, 2016; Riessland *et al.*, 2017) y, por otro muestra en el mismo terminal el deterioro de la exo- y la endocitosis en tiempo real.

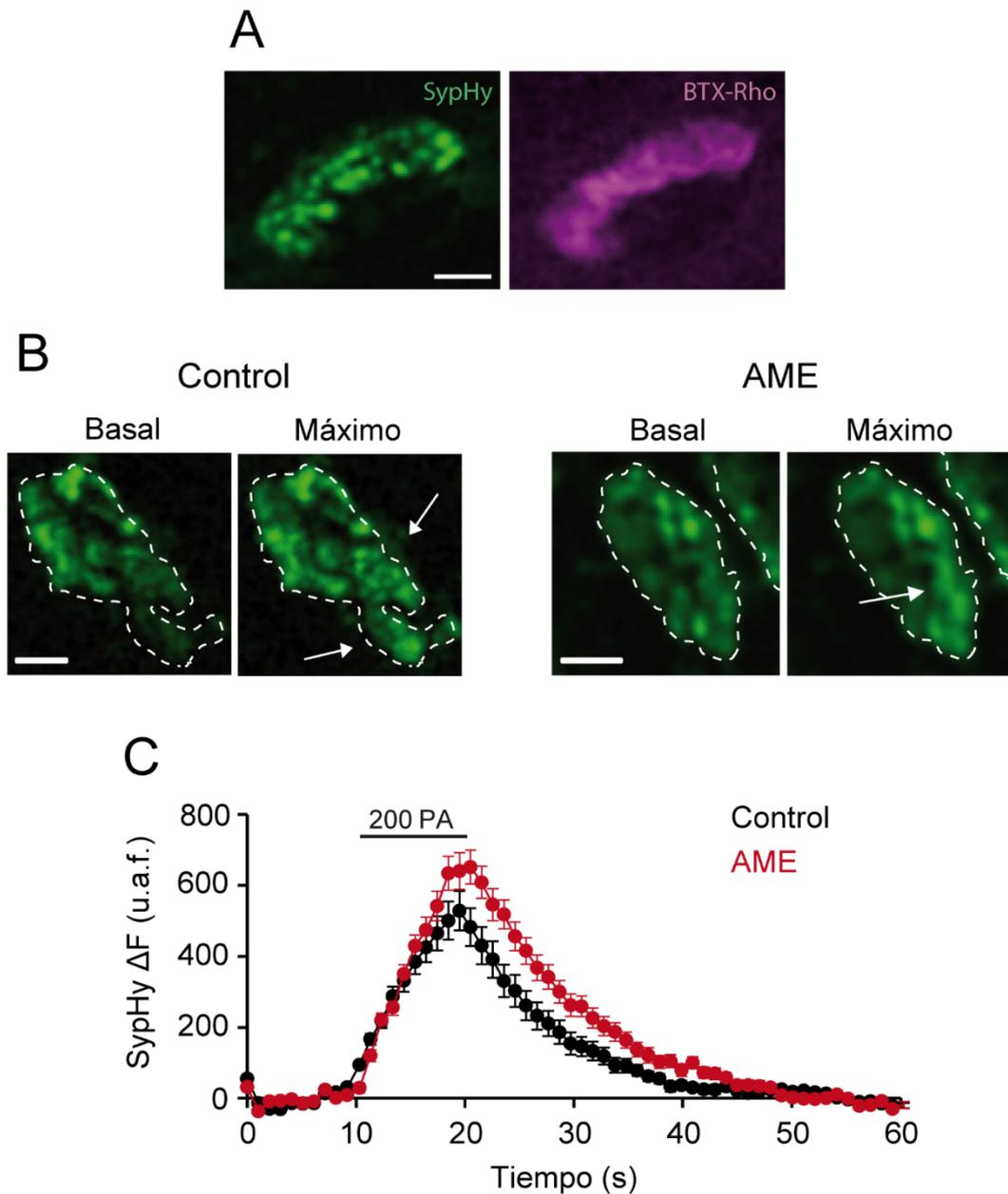


Figura 62. Alteración de la exo-endocitosis en los terminales presinápticos motores AME. **A.** Imágenes *ex vivo* de un terminal nervioso motor que expresa SypHy (izquierda). La placa postsináptica se marcó con BTX-Rho (derecha). Barra de escala: 5 μ m. **B.** Imágenes de las señales de fluorescencia de SypHy en un terminal control y AME (delineados) en reposo (basal) y al final de la estimulación eléctrica (máximo). Las flechas indican las áreas de mayor intensidad durante la estimulación. Nótese la presencia de un segundo terminal en las imágenes del terminal AME (esquina superior derecha) y que responde al estímulo. Barras de calibración: 5 μ m. **C.** Incremento de fluorescencia medio para SypHy antes, durante y después de 200 PA (barra horizontal) en los terminales control (negro; 53 terminales, nueve ratones) y AME (rojo; 45 terminales, cinco ratones).

2.4. Las mitocondrias son esenciales para la exo-endocitosis en los terminales nerviosos motores de la AME

La liberación de neurotransmisor y reciclaje de vesículas mediante endocitosis dependen de la disponibilidad de ATP (Heidelberger, 2001). En particular, la endocitosis es uno de los primeros procesos en verse comprometidos en ausencia de energía (Rangaraju *et al.*, 2014). Dado que las mitocondrias son defectuosas en las neuronas motoras de la AME (Kariya *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2009; Torres-Benito *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2016; Lopez-Manzaneda *et al.*, 2021), nos preguntamos si la glucólisis podría estar homeostáticamente regulada al alza en los terminales nerviosos en AME y, de esta forma, compensar el posible déficit en la síntesis de ATP por la vía de la fosforilación oxidativa. Con el objetivo de responder esta cuestión, comparamos las amplitudes máximas y las constantes de tiempo de relajación de las respuestas de SypHy a la estimulación nerviosa eléctrica en presencia (10 mM) y ausencia (0 mM) de glucosa en la solución extracelular (Fig. 63). En este último caso, la glucosa fue reemplazada por piruvato (1,25 mM) y lactato (1,25 mM) como sustratos para la producción de ATP mitocondrial.

En los terminales controles, la amplitud media del incremento de fluorescencia fue levemente mayor con 0 mM que con 10 mM de glucosa ($691,2 \pm 45,5$ y $602,3 \pm 60,6$ u.a.f., respectivamente; $p = 0,01$, prueba U de Mann-Whitney). En los terminales AME, no hubo diferencias significativas entre ambas condiciones ($721,4 \pm 58,2$ u.a.f. y $722,4 \pm 52$ u.a.f., respectivamente; $p = 0,87$; prueba U de Mann-Whitney). De forma similar, en los terminales controles la constante de tiempo fue significativamente más lenta en 0 mM que en 10 mM de glucosa ($15,5 \pm 1$ s y $9,9 \pm 0,7$ s, respectivamente, $P = 0,0001$, prueba de U-Mann-Whitney), no observándose este fenómeno en los terminales AME ($9,6 \pm 0,6$ s y $10,6 \pm 0,7$ s, $p = 0,4$, prueba U de Mann-Whitney).

Estos resultados indican que las mitocondrias son la fuente principal de ATP durante el ciclo de las vesículas sinápticas en los terminales nerviosos motores, en claro contraste con las sinapsis centrales, en las que la síntesis de ATP por glucólisis es crítica para el ciclo de las vesículas sinápticas (Rangaraju *et al.*, 2014). La exo-endocitosis en los terminales nerviosos controles, no obstante, fue ligeramente sensible a la glucosa extracelular sugiriendo que una pequeña cantidad del ATP procede de la vía glucolítica. Los terminales AME, sin embargo, fueron insensible a la retirada de la glucosa extracelular, indicando que no hay una compensación homeostática a través de esta vía.

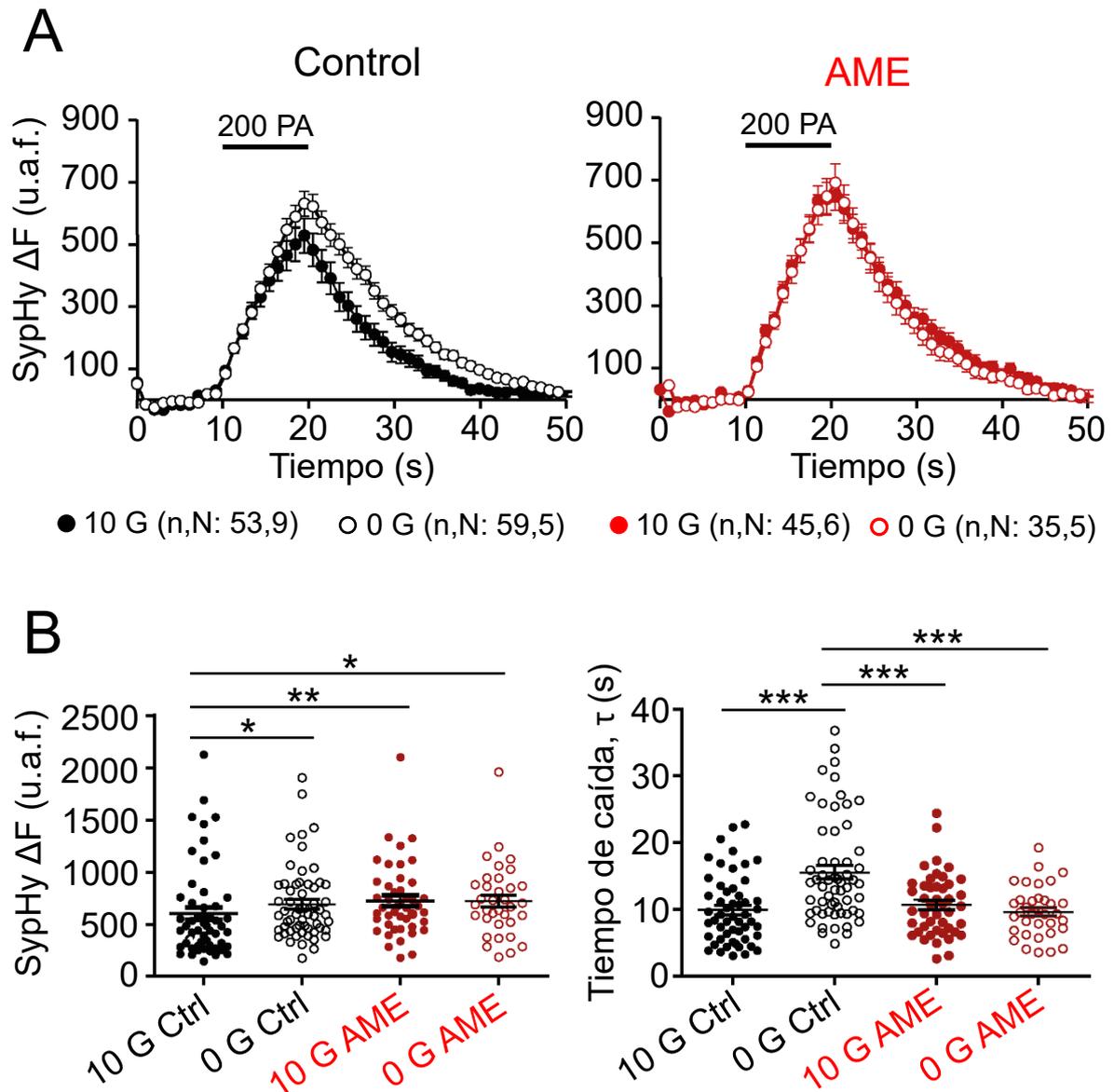


Figura 63. La exocitosis y endocitosis en terminales nerviosos motores depende fundamentalmente de la producción de ATP mitocondrial. A. Evolución temporal de las señales de fluorescencia medias SypHy en respuesta a 200 estímulos a 20 Hz en los terminales control (gráfico izquierdo) y AME (gráfico derecho), en presencia de glucosa 10 mM (símbolos llenos) o en ausencia de glucosa (símbolos vacíos). La glucosa extracelular se sustituyó por 1,25 mM piruvato más 1,25 mM lactato. **B.** Incrementos de fluorescencia máximos (izquierda) y constantes de tiempo de caída (derecha) de las señales correspondientes a los terminales representados en A.

A continuación, para confirmar que el ciclo de exo-endocitosis-reacidificación en los terminales nerviosos mutantes depende de la fosforilación oxidativa, bloqueamos la producción de ATP mitocondrial en ausencia de glucosa. Para ello, después de hacer un registro en condición control (0 glucosa, 1,25 mM piruvato, 1,25 mM lactato) añadimos oligomicina (5 μ g / ml) a la preparación. Esta droga bloquea la producción de ATP mitocondrial por inhibición directa de la ATP sintasa. La Figura 64A (panel izquierdo) muestra dos registros representativos del mismo terminal antes (trazo rojo) y después de 35 min con oligomicina (trazo azul). Con oligomicina, la respuesta fue significativamente menor y la señal se mantuvo elevada tras el fin de la estimulación eléctrica. El gráfico de la derecha en la Figura 64A muestra la superposición de los mismos trazos después de normalizar el trazo azul al rojo, lo que permite comprobar mejor la ralentización del proceso de endocitosis. Las estimulaciones subsiguientes del terminal mediante trenes de pulsos no produjeron respuestas de exo-endocitosis pero si un aumento progresivo de la fluorescencia basal de la membrana (Fig. 64B), lo que confirmó que el proceso de exo-endocitosis-reacidificación requiere de la síntesis de ATP por la mitocondria.

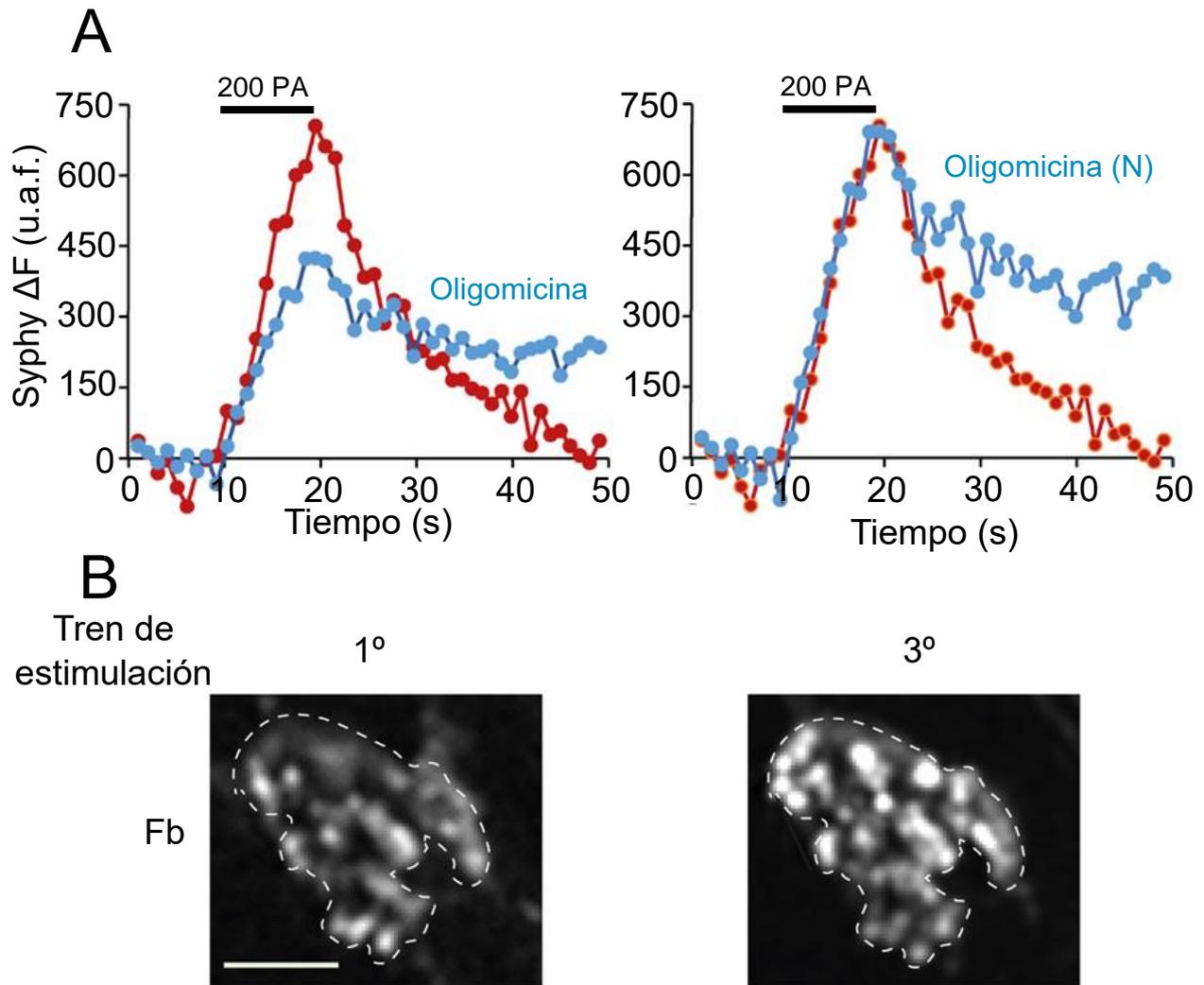


Figura 64. La inhibición de la producción de ATP en la mitocondria disminuye rápidamente la endocitosis y la exocitosis. A. Panel izquierdo: ejemplo representativo de la respuesta de un terminal a 200 AP (barra horizontal) en ausencia (trazo rojo) y en presencia (trazo azul) en oligomicina. Tiempo de incubación con la droga, 35 min. El bloqueo de la síntesis de ATP mitocondrial con oligomicina (5 μ g/ml) disminuye la amplitud máxima de la señal y ralentiza la recuperación de las vesículas tras el tren de estimulación. Panel derecho: los mismos trazos, pero después de la normalización de la amplitud del trazo azul a la rojo. **B.** Ejemplo representativo de la fluorescencia basal de Syphy (Fb) de un terminal nervioso antes del primer (izquierda) y tercer (derecha) tren de estímulos, separados por 10 min. Nótese el aumento de la fluorescencia basal en la imagen de la derecha debido al fallo en la endocitosis-reacidificación de las vesículas previamente exocitadas. Barra de calibración: 5 μ m.

2.5. La actividad eléctrica en los terminales AME no produce despolarización de la mitocondria

La entrada de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial durante la actividad eléctrica en el terminal puede producir una acumulación de cargas positivas si la extrusión de protones a través de la cadena de transporte de electrones no lo compensa adecuadamente. En ese caso, la despolarización del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) resultante disminuiría el gradiente eléctrico para el Ca^{2+} y, por tanto, su entrada. Para examinar esta posibilidad, medimos el Ψ_m con rodamina-123 (Rhod-123), un marcador fluorescente catiónico (Nguyen & Garcia, 2011). Las preparaciones neuromusculares de animales controles y AME se incubaron con $0,3 \mu\text{M}$ Rhod-123 durante 30 min, tras lo cual se lavó la preparación con solución conteniendo $0,03 \mu\text{M}$ Rhod-123.

En los terminales controles, no encontramos cambios en Ψ_m durante el tren de estimulación, como se ilustra en el registro representativo de la Figura 65A (panel izquierdo). Sin embargo, cuando agregamos a la solución de la camarita de registro $500 \mu\text{M}$ de 4-AP, un bloqueante de canales de K^+ que prolonga la duración del PA y, por tanto, aumenta la entrada de Ca^{2+} al citosol, se observó un gran incremento en la fluorescencia (Fig. 65A, panel derecho), tal y como se esperaba. En la mayoría de los terminales AME no se detectó cambio en el potencial de membrana (Fig. 65B, panel izquierdo), excepto en algunos terminales (4 de 34; panel derecho). Es más, la despolarización observada no fue generalizada en todas las mitocondrias del mismo terminal. La Figura 65C (panel izquierdo) muestra dos terminales (T1 y T2) de un ratón AME, en el que la estimulación aumentó la fluorescencia en algunas mitocondrias (2), pero no en otras (1) de T1, pero en ninguno caso en T2. Como control, al final de este experimento se despolarizaron las mitocondrias con CCCP, evidenciándose un incremento progresivo de fluorescencia en las mismas regiones antes señaladas (Fig. 65D). Por tanto, en conjunto, estos resultados indican que la despolarización fue un evento esporádico en las mitocondrias de los ratones AME a la edad en que se hicieron los ensayos (P7-10), descartando esta posibilidad como causa del bajo nivel de Ca^{2+} en las mitocondrias presinápticas durante la actividad eléctrica del terminal.

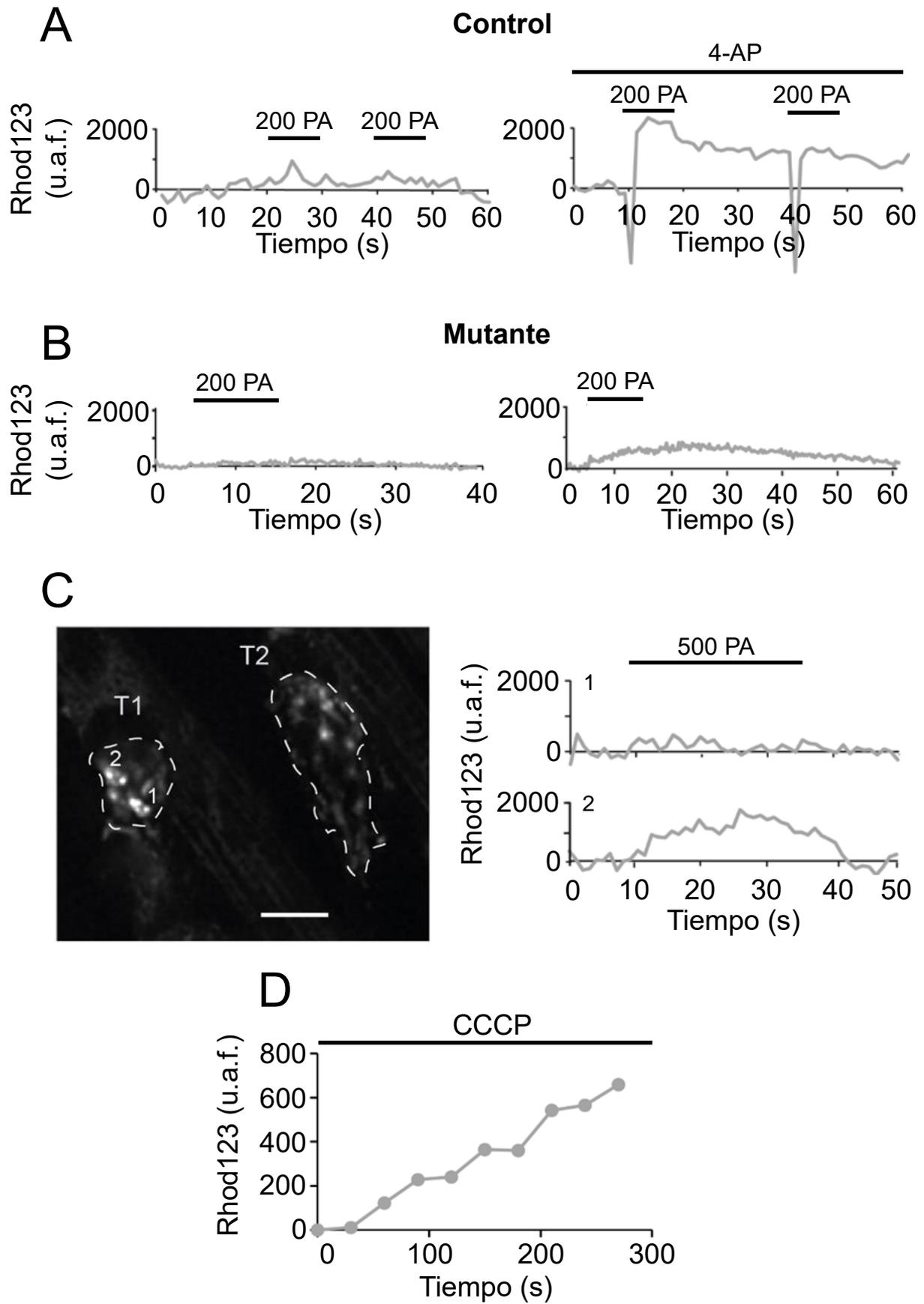


Figura 65 (página anterior). La reducción de Ca^{2+} libre en AME no se debe a la despolarización del potencial de membrana mitocondrial. **A.** En los terminales nerviosos de los ratones de control, la fluorescencia de la rodamina 123 no cambia apreciablemente durante los trenes de 200 PA, como se muestra en el registro representativo del panel izquierdo. Sin embargo, cuando la duración del potencial de acción se prolonga con la aplicación de 4-aminopiridina (4-AP, 500 μM), puede observarse un aumento transitorio de la fluorescencia (gráfico de la derecha) en respuesta al primer tren; nótese los artefactos descendentes al comienzo de los trenes debido a las poderosas contracciones producidas en presencia del bloqueante de los canales de K^+ . **B.** En los terminales presinápticos de los ratones mutantes AME, la fluorescencia no cambia durante 200 trenes AP en la mayoría de las terminales (gráfico de la izquierda), excepto en 4 de 34 registros, como se muestra en el ejemplo (gráfico de la derecha). **C.** Izquierda: imagen de dos terminales, T1 y T2 (delineados), de un ratón mutante AME que muestra seis y cinco puntos fluorescentes, respectivamente. Barra de escala: 10 μm . Derecha: respuestas de los puntos 1 y 2 en T1. No se observaron respuestas en T2. **D.** La aplicación del agente despolarizante mitocondrial, CCCP (1 μM), aumenta lenta y progresivamente la fluorescencia en las mitocondrias del terminal motor en ausencia de estimulación nerviosa.

3. Estudio de la modulación de los canales de calcio en terminales motores AME

Distintas evidencias experimentales indican que en la AME existe una alteración de la homeostasis del calcio en los terminales nerviosos motores, lo que tendría una gran relevancia en la fisiopatología de la enfermedad (Jablonka *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010; Tejero, 2016; Tejero *et al.*, 2016, 2020). Por un lado, estudios electrofisiológicos *ex vivo* en terminales nerviosos motores AME han observado una reducción de la liberación evocada y un aumento de la frecuencia de liberación asincrónica durante la actividad eléctrica (Kong *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010; Torres-Benito *et al.*, 2011; Tejero, 2016; Tejero *et al.*, 2016). Estas alteraciones coexisten con una aparente reducción de los canales de calcio voltaje dependientes (VGCC) de tipo P/Q en el compartimento presináptico (Tejero, 2016; Tejero *et al.*, 2020). En este contexto, hipotetizamos que la modulación positiva de los canales de calcio tipo P/Q podía aportar beneficios en la funcionalidad del terminal nervioso motor.

Para ello caracterizamos mediante registros electrofisiológicos el efecto de GV-58, un modulador positivo de los VGCC tipo 2 (Cav 2), sobre la neurotransmisión en ratones controles y mutantes AME de edades comprendidas entre P7 y P10.

3.1. Efecto de GV-58 sobre la neurotransmisión en el terminal nervioso motor

La R-roscovitina es una molécula inhibidora de la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) que, además, tiene actividad moduladora agonística sobre los canales tipo Cav2. Distintos autores han mostrado que R-roscovitina incrementa la liberación de neurotransmisor en sinapsis centrales (Tomizawa *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2002; Kim & Ryan, 2010) y en la NMJ, tanto de rana (Cho & Meriney, 2006) como de ratones (Tejero, 2016; Tejero *et al.*, 2020). GV-58 es un derivado de la Roscovitina y, al igual que ésta, aumenta el tiempo medio de apertura de los canales Cav2 (Tarr *et al.*, 2012, 2013; Wu *et al.*, 2019). En este sentido es más potente que la R-roscovitina y tiene escasa actividad

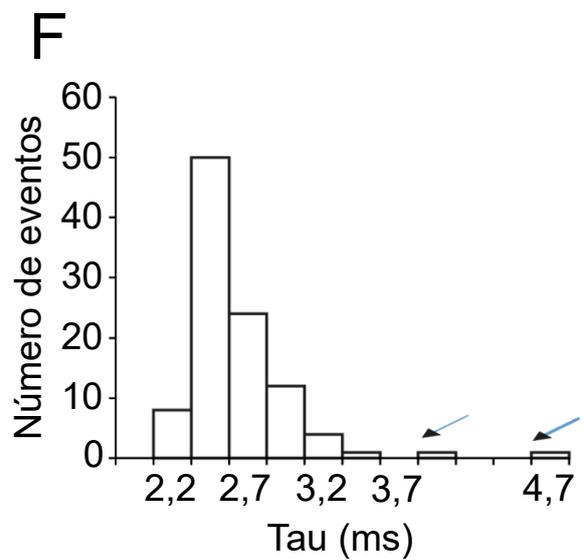
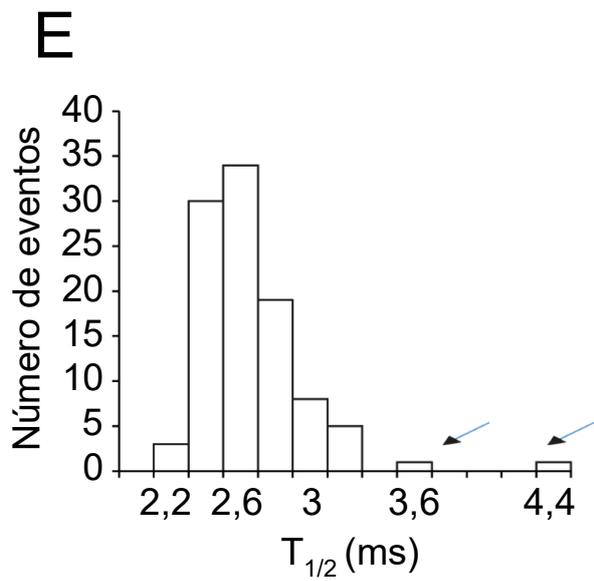
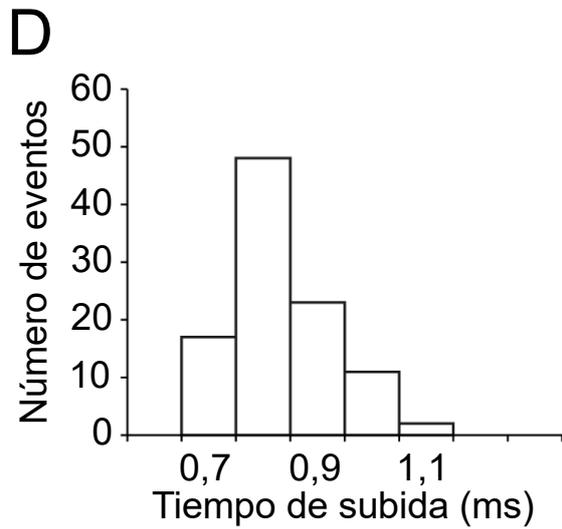
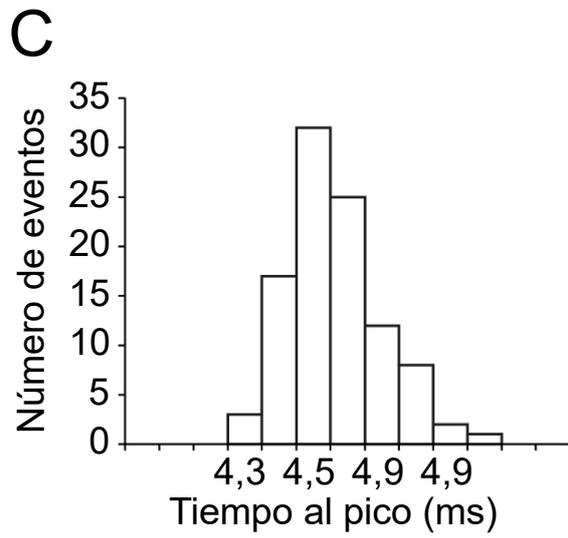
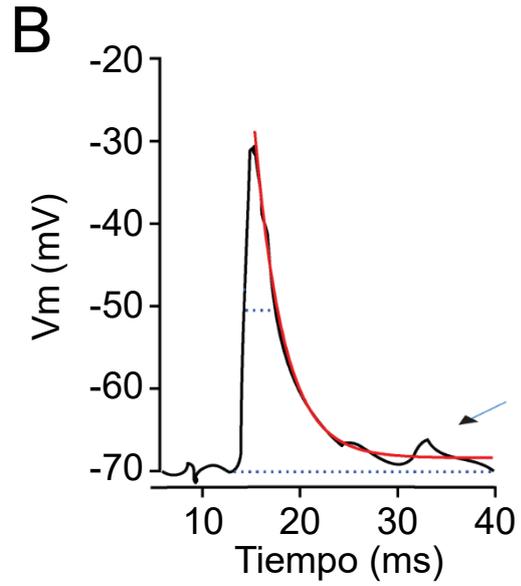
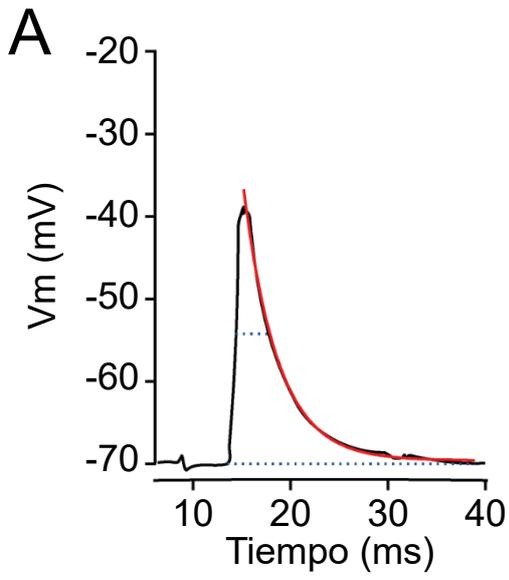
inhibidora de CdK-5, características de interés si se quiere estudiar su posible efecto potenciador de la entrada de Ca^{2+} al terminal presináptico en ratones AME.

En el presente trabajo, hipotetizamos que la modulación positiva de la actividad de los VGCC mediante GV-58 mejora la funcionalidad de las NMJ. Inicialmente, caracterizamos el efecto que la aplicación de GV-58 (20 μM) tiene sobre la neurotransmisión en el terminal motor de los ratones controles para lo que comparamos las características de los potenciales evocados en ausencia y en presencia de la droga.

En ausencia de GV-58 (Fig. 66), las características cinéticas de los EPP fueron uniformes durante la estimulación repetida a baja frecuencia (Fig. 66A y C-F). Solo en un pequeño porcentaje de fibras, algunos eventos evocados (< 4%) presentaron o bien un segundo pico durante la fase de relajación (Fig. 66B, flecha), o fueron más anchos de lo esperado (Fig. 66E, flechas) o su constante de tiempo de relajación fue lenta (Fig. 66F, flechas).

En presencia de GV-58 (20 μM ; Fig. 67), por el contrario, lo más frecuente fue encontrar eventos anchos, con más de un pico o con una pequeña meseta en la fase de repolarización (Fig. 67A). El tiempo de subida del EPP, sin embargo, no fue significativamente distinto con y sin droga (Fig. 67B y 66D), indicando que la droga, a las concentraciones utilizadas, no modifica la rapidez a la que se produce la liberación sincrónica. En la Figura 67C, se muestra un ejemplo de la anchura media ($T_{1/2}$) de los EPP en presencia de la droga, observándose el incremento antes mencionado (comparar con Fig. 66E).

Figura 66 (página siguiente). La liberación evocada es sincrónica en ausencia de GV-58 en los ratones controles. A y B. Ejemplo de dos potenciales evocados de características cinéticas similares. La fase de relajación de cada evento se ha ajustado a una exponencial (línea roja). La anchura del EPP a la mitad de la amplitud máxima ($t_{1/2}$) se muestra con una línea discontinua. Nótese que el evento en B presenta un segundo pico. **C.** Histograma de frecuencia del tiempo al pico medido desde el pico negativo del artefacto al valor máximo del EPP. **D.** Tiempo de subida del EPP medido desde el 10% de la señal al máximo. **E.** Ancho un medio de los EPP. **F.** Constante de tiempo de relajación. Nótese que la gran mayoría de los eventos siguen una distribución normal, excepto eventos esporádicos señalados con flechas.



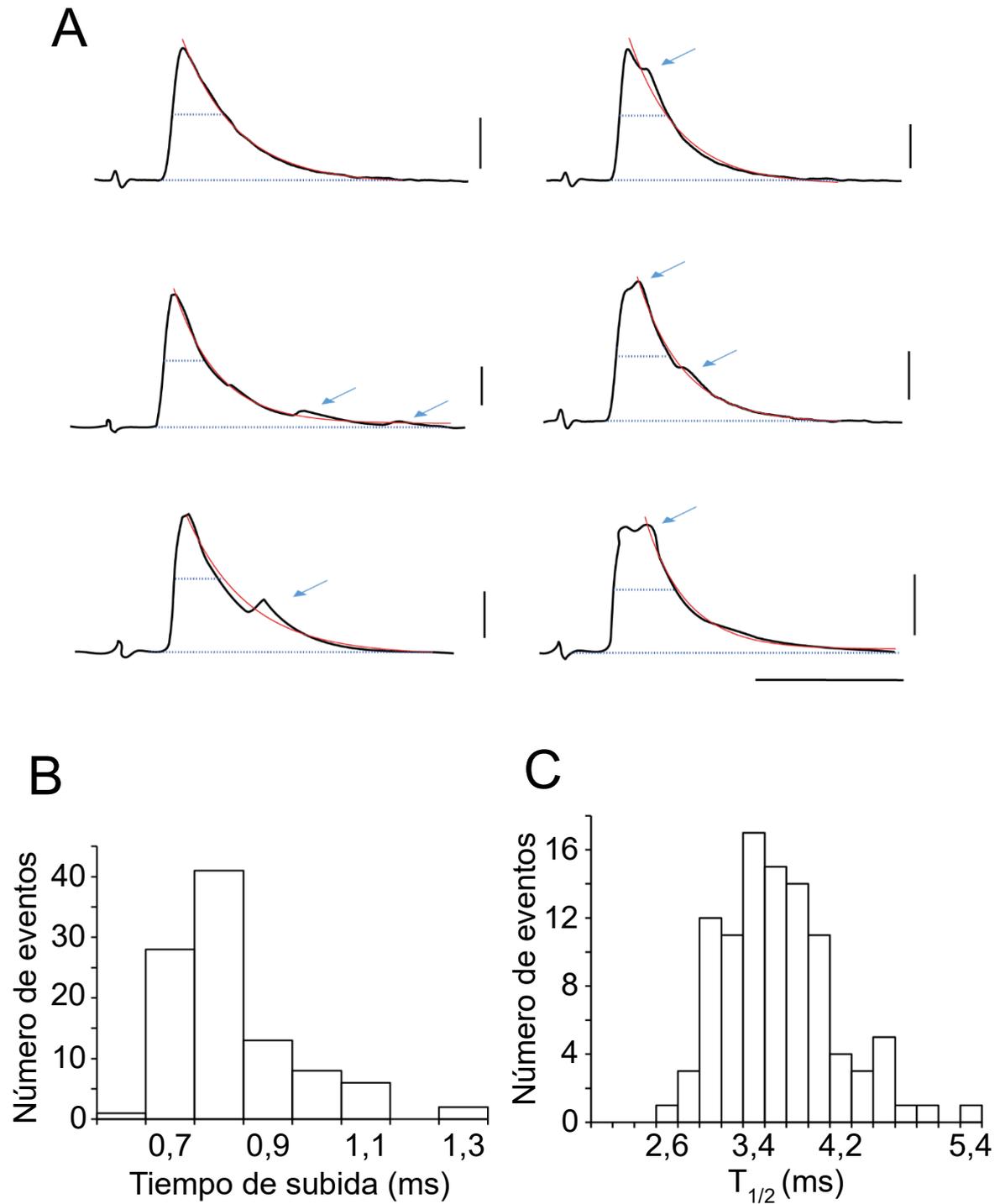


Figura 67. GV-58 aumenta la duración de los EPP en los ratones controles. A. Ejemplos representativos de potenciales evocados registrados en presencia de 20 μ M GV-58. Se señalan con flechas las fusiones asincrónicas. La fase de relajación de cada evento se ha ajustado a una exponencial (línea roja). La anchura del EPP a la mitad de la amplitud máxima ($T_{1/2}$) se muestra con una línea discontinua. **B.** Tiempo de subida del EPP medido desde el 10% de la señal al pico máximo. **C.** Ancho un medio de los EPP.

3.2. GV-58 incrementa los eventos de liberación tras el estímulo mediante fusiones asincrónicas

Ante la presencia de evocados ensanchados y/o con un segundo pico, hipotetizamos que GV-58 pudiera estar induciendo la fusión de cuantos individuales asincrónicamente. Para contrastar esta hipótesis planteamos dos abordajes.

Por un lado, partiendo del registro de un EPP y un mEPP típicos (Fig. 68A), realizamos simulaciones del mismo EPP tras sumarle la fusión asincrónica de uno o dos cuantos a intervalos de tiempo variables (entre 1 y 9,75 ms). La Figura 68B muestra el EPP registrado (línea gris) y el simulado (línea negra). Los paneles para cada intervalo de tiempo muestran cómo cambia la morfología del EPP al añadir la fusión asincrónica de un solo cuanto (paneles izquierdos) o de dos cuantos a la vez (paneles derechos). Como se aprecia en la figura, cuando se produce la liberación asincrónica la morfología del potencial evocado sufre una modificación sutil si ésta se produce muy próxima en el tiempo con la respuesta sincrónica, con un incremento de la amplitud del potencial resultante (Fig. 68B, 1 ms). Sin embargo, conforme el intervalo entre liberaciones aumenta, la despolarización provocada por la liberación asincrónica compensa parcialmente la repolarización de la primera respuesta, dando como resultado un proceso de aplanamiento del potencial evocado (Fig. 68B, 2 ms). Si el intervalo entre ambas respuestas sigue aumentando, se produce una deformación de la fase de repolarización, llegando a observarse una pequeña meseta (Fig. 68B, 5 ms) resultado de una despolarización por parte del cuanto similar a la repolarización de la primera respuesta. Intervalos entre respuestas mayores a este punto implica la producción de un segundo pico por parte del cuanto extra liberado, ya que la despolarización que evoca es mayor que la repolarización de la respuesta inicial (Fig 68B, 9,75 ms), siendo más claro cuanto más alejados estén ambas respuestas.

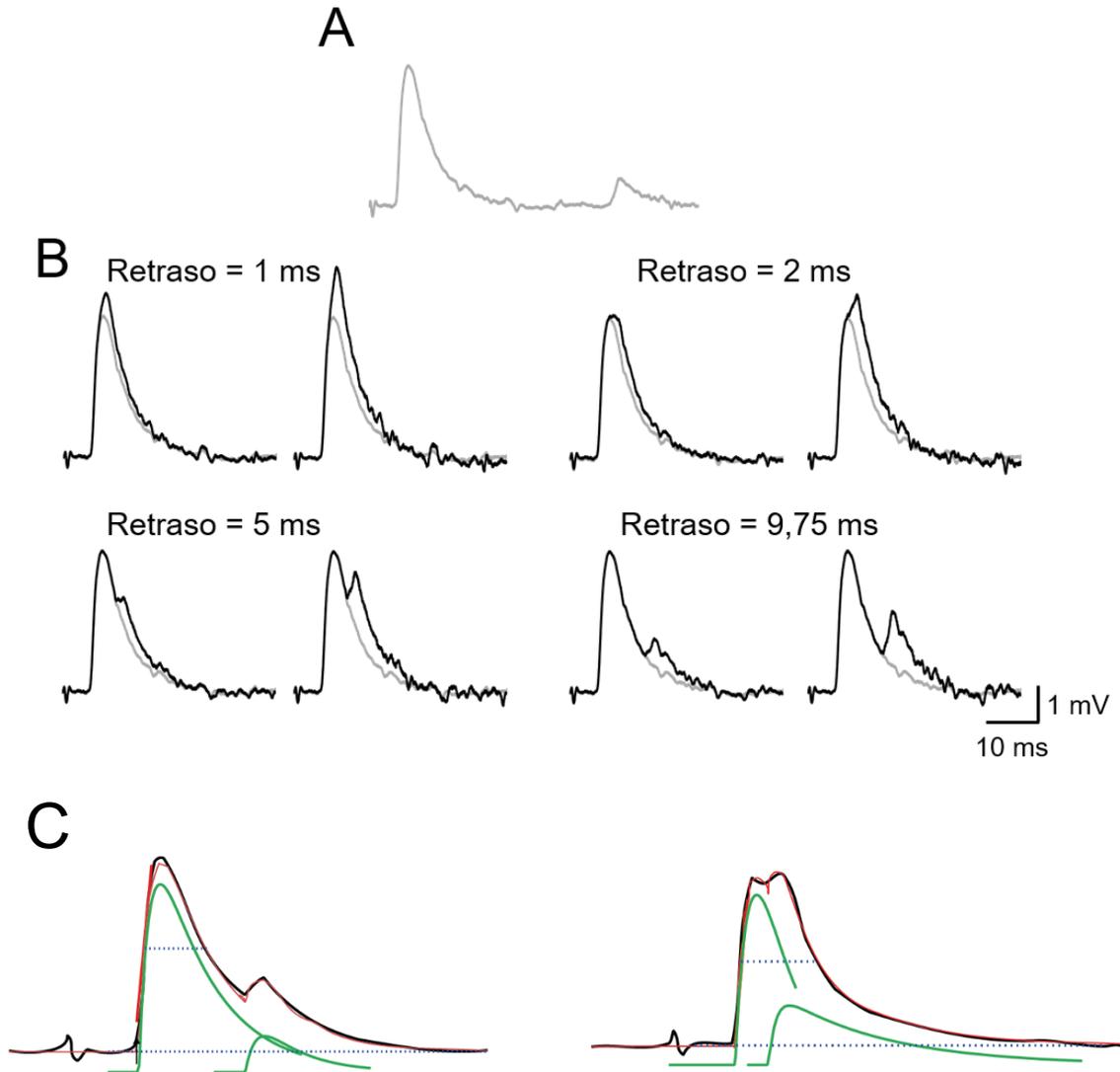


Figura 68. Las respuestas múltiples observadas en los experimentos con GV-58 son compatibles con la suma de fusiones sincrónicas y asincrónicas. A. Trazo electrofisiológico del EPP (izquierda) y mEPP empleado en las simulaciones. **B.** Simulaciones de potenciales de placa suponiendo diferentes intervalos (1, 2, 5 y 9,75 ms) entre la liberación evocada (EPP) y la liberación de un cuanto adicional (mEPP). Para cada tiempo, se supuso una liberación adicional equivalente al mEPP original (paneles izquierdos) o de doble de amplitud (paneles derechos). Nótese, la aparición de un solo pico cuando el intervalo entre respuestas es de corta duración y la aparición de un segundo pico si el intervalo aumenta. **C.** Ejemplos de la descomposición de dos EPP registrados (trazos negros en panel izquierdo y derecho) en picos individuales (líneas verdes, desplazadas en sentido vertical para su mejor apreciación). Las líneas rojas representan la suma de los picos individuales. Nótese la bondad del ajuste.

Por otro lado, realizamos el ajuste de los EPP registrados que presentaban dos o más picos a una función compleja (multipicos) mediante una subrutina de Igor, cortesía del Prof. Guillermo Álvarez de Toledo (Fig. 68C). Inicialmente, se realizó un ajuste del EPP a una exponencial monomial (línea roja). En los casos en los que el ajuste no era bueno se pasó a hacer un ajuste exponencial polinomial, correspondiendo cada pico del EPP a cada uno de los términos del ajuste. De esta forma se pueden obtener tanto la amplitud del evocado, la del evento asincrónico, como el intervalo entre los dos tipos de eventos.

En conjunto, estos resultados muestran que GV-58 es una droga eficaz para incrementar la liberación de neurotransmisor al inducir la fusión de más vesículas inmediatamente después de la liberación sincrónica. Ello se traduce en un aumento en la duración del EPP y, posiblemente, de la contracción, lo que podría aumentar la tensión que puede desarrollar el músculo durante la actividad eléctrica repetida.

3.3. Los terminales motores AME responden a la exposición a GV-58 de forma similar a los terminales controles

Una vez demostrado el aumento en la liberación de cuantos individuales adicionales durante la liberación evocada, hipotetizamos que esta liberación era específica del proceso de liberación evocada y no secundaria a un incremento de la liberación espontánea de cuantos.

Para abordar esta cuestión, se contabilizó la frecuencia de eventos de liberación en función del tiempo transcurrido tras el estímulo, tanto en ausencia de la droga como en presencia de distintas concentraciones de GV-58. Llamamos *eventos de liberación espontánea* a los ocurridos tras 50 ms del pico del EPP y *eventos asociados temporalmente a la estimulación o asincrónicos*, los producidos durante los primeros 50 ms tras el pico del EPP.

La frecuencia de los *eventos espontáneos* aumentó en presencia de 20 μ M GV-58, tanto en terminales de animales controles como modelo de AME (Fig. 69A, respectivamente). Sin embargo, el contenido cuántico, medido a partir de la amplitud del primer pico del EPP, no aumentó significativamente con GV-58 (1-20 μ M) (Fig. 69B),

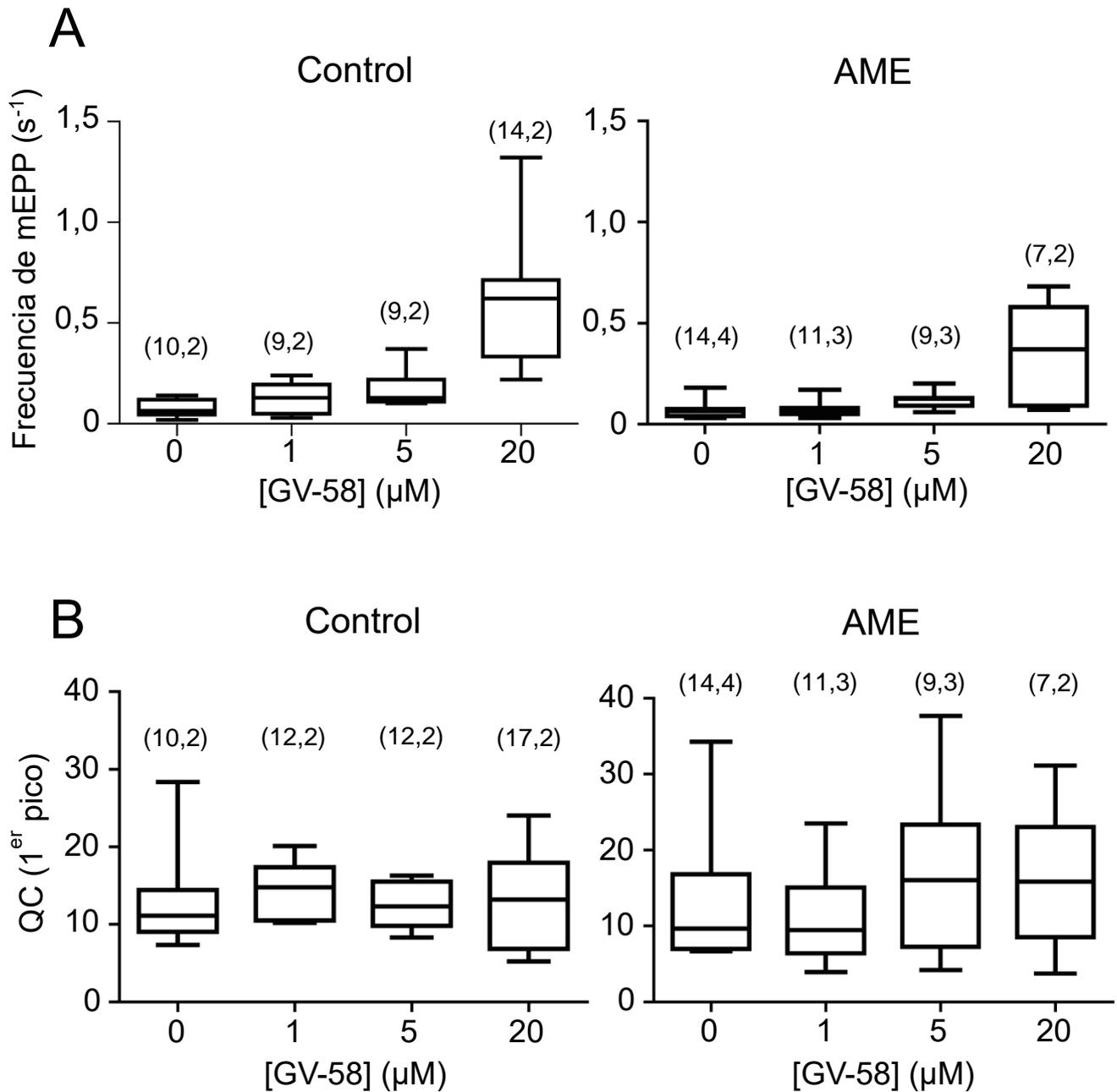


Figura 69. Efectos de GV-58 sobre la liberación espontánea en ratones control y mutante AME. Comparación de la frecuencia de mEPP (**A**) y del contenido cuántico (QC) correspondiente al primer pico del EPP (**B**) con distintas concentraciones de GV-58 en ratones controles (izquierda) y ratones mutantes AME (derecha). Nótese el efecto de la droga sobre la liberación espontánea (mEPP) con 20 μ M. Entre paréntesis aparecen el número de fibras registradas y de ratones empleados, respectivamente.

en ninguno de los genotipos, lo que muestra que la droga no aumenta los cuantos liberados de forma sincrónica a esta concentración. Por otro lado, la frecuencia de *eventos asincrónicos* se incrementó de forma similar en ambos genotipos (Fig. 70B), alcanzando valores medios de un orden de magnitud superior al incremento de la liberación espontánea (comparar con 69A).

Estos datos, en su conjunto, demuestran que el efecto de GV-58 sobre la liberación es similar en ratones controles y mutantes AME, lo que sugiere que pudiera ser efectivo terapéuticamente para la potenciación de la neurotransmisión en la NMJ. Además, demuestran que su efecto sobre la liberación de cuantos individuales es dual. Por un lado, GV-58 aumenta la liberación tras el estímulo y, por otro, aumenta la liberación espontánea.

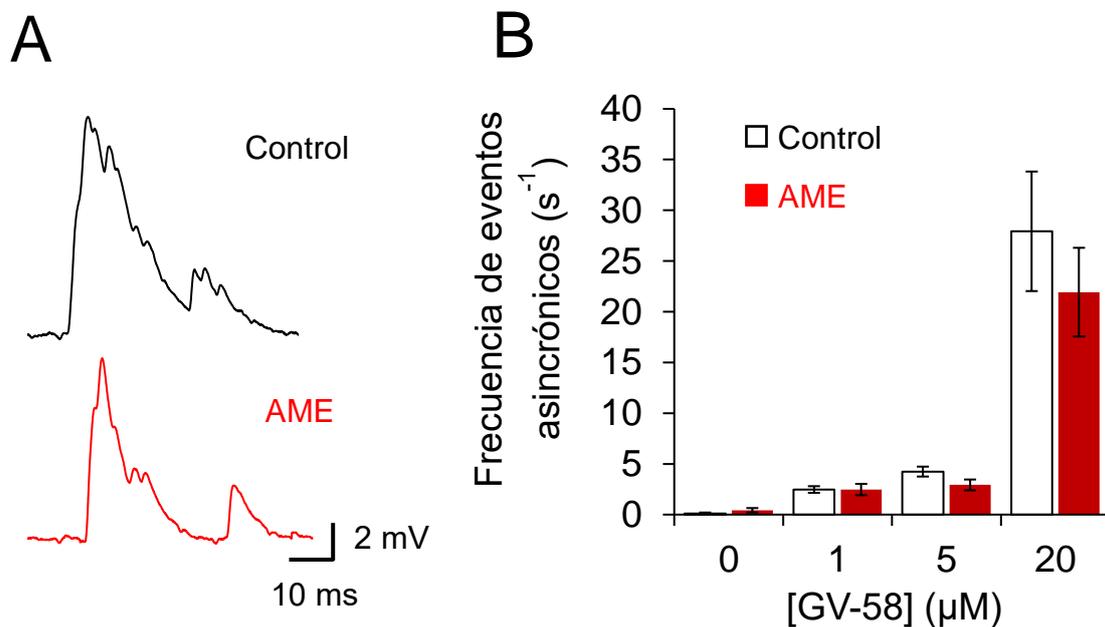


Figura 70. GV-58 incrementa la frecuencia de eventos de liberación asincrónica tras la estimulación en ratones controles y mutantes AME. **A.** Ejemplos representativos de EPP complejos con GV-58 20 μM en ratones control (negro) y mutante AME (rojo). Se consideraron eventos asincrónicos aquellos que se producen en los 50 ms tras la respuesta evocada (primer pico del EPP). **B.** Gráfica comparativa con la frecuencia media de eventos asincrónicos a distintas concentraciones de GV-58 en ratones control y mutantes AME.

Discusión

En este trabajo hemos estudiado la expresión y distribución de la proteína Smn endógena y SMN heteróloga durante la maduración postnatal en axones y terminales presinápticos motores en ratones silvestres y en modelos de AME, respectivamente. Tanto la proteína endógena como la heteróloga aparecen en gránulos que se distribuyen a lo largo de los axones y se disponen de forma relativamente ordenada en el interior de los terminales nerviosos en la NMJ. En los ratones silvestres, el número de granos axonales y preterminales de Smn disminuyen progresivamente durante las dos primeras semanas de vida hasta hacerse imperceptibles en la edad adulta. Sin embargo, la expresión heteróloga de la proteína SMN en los ratones transgénicos se mantiene constante durante este periodo. Nuestros resultados muestran, así mismo, una potencial asociación de los NF con de los gránulos de Smn en los ratones silvestres, asociación que también se observa en los ratones controles y SMA que expresan SMN heteróloga. No obstante, la sobreexpresión de SMN da lugar a acúmulos de la proteína en los axones y terminales nerviosos motores en los controles y en los modelos AME (taiwanés y SMN Δ 7). A medida que progresa la enfermedad, los acúmulos de SMN aumentan de tal forma que, en algunos terminales llegan a ocupar la totalidad del mismo. Los acúmulos de SMN coinciden con los de NF en el terminal presináptico y en los axones, contribuyendo al colapso del terminal nervioso.

La función fisiológica de los granos de Smn (SMN) en los axones y terminales presinápticos no está demostrada aún. No obstante, en nuestro estudio demostramos que durante la etapa postnatal los granos coexisten en el terminal presináptico con dos de los elementos de la maquinaria de síntesis proteica, ribosomas y ARNm de β -actina. Estos resultados apoyan la hipótesis planteada en neuronas en cultivo de que los granos de SMN participan en la síntesis local de proteínas.

En la segunda parte de nuestro trabajo hemos investigado las alteraciones funcionales del terminal nervioso motor en AME. Por un lado, mediante la caracterización de los defectos de neurotransmisión mediante el registro de los potenciales postsinápticos en el modelo taiwanés, del que hasta ahora se disponía de escasa información electrofisiológica y, por otro, la alteración de la exocitosis, la endocitosis y la homeostasis de calcio mitocondrial mediante imagen dinámica. Nuestros resultados muestran que la actividad mitocondrial es crítica para el mantenimiento de la exocitosis y el reciclado de las vesículas sinápticas, tanto en controles como en mutantes, y que la producción de ATP por la vía glucolítica no juega un papel importante en esta

sinapsis. Finalmente, hemos investigado la capacidad de un agonista de los canales de calcio dependientes de potencial tipo 2 (Cav2), concretamente el GV-58, compuesto derivado de la R-roscovitina, para aumentar la liberación de neurotransmisor en terminales nerviosos motores de ratones controles y modelo de AME durante el periodo postnatal temprano. Encontramos que esta molécula prolonga la duración de los potenciales postsinápticos en los dos genotipos de forma dosis dependiente.

A continuación, se discute los principales aspectos de los resultados y las posibles implicaciones futuras que pudieran tener.

1. Función periférica de SMN en las motoneuronas

Principalmente, existen dos hipótesis sobre los mecanismos por los que la deficiencia de SMN causa vulnerabilidad en las motoneuronas en AME. La primera apunta a que la afectación de la función de las snRNP altera la producción de proteínas necesarias para las motoneuronas (Pellizzoni, 2007; Burghes & Beattie, 2009); no obstante, aún no se ha podido demostrar la relación entre los defectos en el corte y empalme del ARNm y la patogénesis de la AME. La segunda apunta a un papel adicional y específico de SMN en las motoneuronas (Pellizzoni, 2007; Burghes & Beattie, 2009).

En nuestro trabajo hemos determinado el curso temporal de la expresión fisiológica de la proteína Smn, así como su organización, en el axón y terminal presináptico motor en ratones silvestres durante la etapa maduración postnatal. Sin embargo, existen aún varios interrogantes sobre estos gránulos, como su composición exacta de los mismos *in vivo* y su papel funcional durante el desarrollo y maduración de las motoneurona.

1.1. Función de SMN en el axón

En el presente trabajo hemos demostrado que Smn se expresa fisiológicamente en forma de gránulos en los axones de los ratones silvestres y modelos de AME (Fig. 31 y 32). Estos datos corroboran la organización granular de SMN previamente descrita en los axones de motoneuronas en cultivo (Dombert et al., 2014). Aunque la función *in vivo* de los granos axonales de SMN es aún desconocida, estudios *in vitro* han demostrado que la

composición de los gránulos axonales es distinta a la de los gránulos en el soma. Por ejemplo, en el axón, carecen de la proteína Sm (Zhang et al., 2006; Todd et al., 2010a), esencial para el metabolismo de las snRNP en el soma y el núcleo. Así mismo, estudios en cultivos de motoneuronas han determinado que los gránulos axonales contienen proteínas de unión a ARNm que hace su composición distinta a los gránulos del soma.

En relación con el tamaño de los granos axonales, se han descrito dos poblaciones en neuronas *in vitro*: grandes, $> 0,5 \mu\text{m}$ de diámetro, con movimiento oscilatorio-estático, y pequeños, $< 0,5 \mu\text{m}$, con movimiento rápido bidireccional (Todd, Shaw, et al., 2010). En nuestro trabajo, los granos en el axón de los ratones silvestres fueron de tipo pequeño (Fig. 32). En el modelo AME, en cambio, encontramos granos $> 0,5 \mu\text{m}$, aunque la mayoría presentan un diámetro menor (Fig. 37B). El hecho de encontrar granos de mayor tamaño en el modelo AME sugiere que bien la sobreexpresión de proteína heteróloga, o bien la presencia de proteína truncada en los granos, impacta en la morfología aparente de los mismos. En este contexto, los experimentos realizados por Todd y colaboradores se realizaron en cultivos de células humanas SH-SY5Y que expresan un constructo SMN-EGFP, lo que sugiere que la sobreexpresión de SMN, completa o truncada, contribuye a la aparición de granos de mayor tamaño. En futuros experimentos sería de interés estudiar la movilidad de los granos *ex vivo*, tanto en ratones silvestres como en modelos que sobreexpresen SMN completa y truncada.

Se ha postulado que SMN podría estar participando en la síntesis local de proteínas en los axones y conos de crecimiento de motoneuronas *in vitro* (Fallini et al., 2016). En cultivos de motoneuronas, SMN participa en el ensamblaje de las mRNP, siendo necesaria para su traslocación y tráfico axonal (Donlin-Asp et al., 2016, 2017; Price et al., 2018). Entre las RBP cotransportadas con SMN en motoneuronas en cultivo se encuentran hnRNP R, HuD e IMP1 (Rossoll et al., 2002; Akten et al., 2011; Fallini et al., 2011, 2014; Hubers et al., 2011). Sirva como ejemplo paradigmático la mRNP formada por IMP1 y el ARNm de β -actina. En cultivos de motoneuronas deficientes en SMN, el ensamblaje de esta mRNP y la localización axonal y en el cono de crecimiento del ARNm de β -actina están alterados (Rossoll et al., 2002; Donlin-Asp et al., 2017). IMP1/ β -actina también se ha descrito *in vivo* en unas estructuras periaxoplásmicas que contienen ribosomas en axones motores de rata adulta (Koenig & Martin, 1996; Koenig & Giuditta, 1999; Koenig et al., 2000; Kun et al., 2007; Sotelo-Silveira et al., 2008). Aunque estas estructuras no se han identificado durante la maduración postnatal, sí se han

descrito ribosomas en axones motores durante este periodo, estando reducidos en número en ratones AME (Bernabò *et al.*, 2017). Sería de interés estudiar la potencial afectación de la maquinaria de síntesis de proteínas en la axones AME. Alternativamente, los granos de SMN pueden simplemente estar siendo transportados al terminal motor, donde ejercerían su función (ver siguiente apartado).

En el presente trabajo hemos tratado de caracterizar en preparaciones neuromusculares la composición de los granos de SMN mediante inmunomarcaje de gemina 2 y 3, HuD y Cpg 15, cuya presencia en los gránulos de SMN ha sido demostrada en cultivos celulares (Zhang *et al.*, 2006; Todd, Morse, Shaw, McGinley, *et al.*, 2010; Todd, Shaw, *et al.*, 2010; Akten *et al.*, 2011; Fallini *et al.*, 2011; Hubers *et al.*, 2011). En nuestros ensayos, sin embargo, no conseguimos señal clara en los axones y terminales motores para ninguna de estas cuatro proteínas. Para la interpretación de estos resultados hay que tener en cuenta distintas variables. En primer lugar, el tejido conectivo de las preparaciones neuromusculares dificulta en gran medida la permeabilización y el acceso del anticuerpo a la proteína diana, en contraste con la fácil permeación en los cultivos celulares, lo que dificulta la detección de proteínas con niveles muy bajos de expresión. En segundo lugar, no es seguro que la estequiometría y estructura de gránulos axonales de RNP sea igual *in vitro* e *in vivo*. Es llamativo, no obstante, que detectásemos sin dificultad SMN, que también está presente en los gránulos axonales y presenta un tamaño del mismo orden que Gemina 2, Gemina 3 y HuD. Sin embargo, en el caso de SMN el anticuerpo empleado es policlonal, a diferencia de los monoclonales empleados para detectar Gemina 3 y HuD. La existencia de múltiples clones de anticuerpos con distintos epítopos incrementa la probabilidad de detectar regiones no enmascaradas y, además, amplifica la señal al poder reconocer múltiples regiones de la misma proteína. No obstante, Gemina 2 no pudo ser detectada, aun empleando un anticuerpo policlonal.

Por otro lado, no se puede descartar la posibilidad de cambios temporales en la composición de los granos. Es posible que ciertas mRNP se expresen o se asocien a SMN únicamente durante etapas tempranas del desarrollo. Por ejemplo, en embriones de pez cebra SMN coinmunoprecipita con HuD solo durante la ventana temporal de crecimiento y arborización axonal (Hao *et al.*, 2017). Así mismo, aunque SMN se reduce drásticamente en las motoneuronas tras el desarrollo (Fig. 33) y maduración de la motoneurona, ciertas mRNP cuyo tráfico axonal es dependiente de SMN, como IMP1/ β -actina, están presente en axones motores adultos (Sotelo-Silveira *et al.*, 2008). Sería, por

tanto, de especial interés la caracterización molecular de los granos de SMN con técnicas bioquímicas a partir de un nervio durante las distintas etapas de la maduración de la motoneurona.

HuD, por otra parte, pudo ser identificada en médula espinal con el mismo anticuerpo utilizado en las preparaciones neuromusculares. De hecho, el marcaje fue muy intenso, tanto en el asta ventral como en el resto de las regiones medulares. Hasta donde sabemos, somos el primer grupo en identificar la proteína HuD *in situ* en las motoneuronas espinales durante la maduración postnatal temprana. La señal fue, además, de características similares a la señal reportada por grupos previos en los DRG y en el asta dorsal de médula espinal de ratones adultos (Sanna *et al.*, 2014) y en las motoneuronas espinales humanas (Blokhuys *et al.*, 2016). Curiosamente, no hemos encontrado diferencias en la intensidad de la señal entre animales controles y AME, en concordancia con trabajos del grupo de Rossol y Bassel que muestran que en cultivos de motoneuronas de ratón sometidas a silenciamiento de *Smn* los niveles de HuD en el axón son dependientes de *Smn*, pero no en el soma o las dendritas (Fallini *et al.*, 2011). En embriones de pez cebra la disminución experimental de *Smn* se acompaña de bajos niveles de expresión de HuD durante la fase de crecimiento y arborización axonal. En este modelo, el rescate de la expresión de *Smn* antes de las 24 h postfertilización aumenta los niveles HuD, aunque esto no ocurre si el rescate se hace después (Hao *et al.*, 2017). Puesto que nuestros experimentos se realizaron en una etapa postnatal, es posible que ya haya desaparecido la posible regulación de HuD por *Smn*, no obstante, este mecanismo pudiera ser relevante en la regeneración axonal y el remodelado de la NMJ. De hecho, estudios *ex vivo* en las aferencias sensoriales a la médula espinal han demostrado un incremento de los niveles de HuD en respuesta al daño axonal (Sanna *et al.*, 2014, 2017). Sería interesante, pues, estudiar la relación entre SMN y HuD en este contexto.

Así mismo, durante la etapa postnatal temprana, HuD podría estar participando en la maduración del circuito motor a nivel de la médula espinal. Esta hipótesis se sustenta en la participación de HuD en la sinaptogénesis en cerebro a través de la estabilización y regulación de la expresión dendrítica de BDNF (Vanevski & Xu, 2015). En la AME, las entradas sinápticas sensoriales excitatorias de las motoneuronas espinales están afectadas (Mentis *et al.*, 2011). Sin embargo, en la médula espinal no hemos observado ningún enriquecimiento de HuD en los botones presinápticos ni tampoco a nivel postsináptico,

lo que sugiere que este mecanismo puede no estar implicado en las alteraciones sinápticas descrita en AME.

1.2. Función de SMN en el terminal motor

En este trabajo, hemos mostrado por primera vez la coincidencia espacial entre MAP1B, proteína estabilizadora de los MT que participa en el desarrollo neuronal de axones y conos de crecimiento (Villarreal-Campos & Gonzalez-Billault, 2014) y SMN. Se ha demostrado que MAP1B interacciona con HuD (Fujiwara et al., 2011) por lo que MAP1B pudiera estar actuando como nexo entre los granos de SMN y los microtúbulos. Nuestros resultados sugieren, no obstante, una relación más estrecha entre los granos de SMN y los NF. Sería, por tanto, de interés caracterizar bioquímicamente la relación entre estas tres proteínas. Desconocemos la funcionalidad de la interacción entre los granos de SMN y el citoesqueleto pero proponemos que determina la especial distribución de SMN en el terminal (ver, por ejemplo, Fig. 38).

Aún se no ha demostrado el papel de SMN en la sinapsis pero se sabe que la síntesis local de proteínas, uno de los roles postulados de SMN, juega un papel clave en la plasticidad, desarrollo y mantenimiento sináptico (Swanger & Bassell, 2011). Es especialmente interesante el caso del ARNm de β -actina, cuyo ensamblaje en ciertas mRNP y tráfico axonal es dependiente de SMN en motoneuronas en cultivo (Rossoll *et al.*, 2002; Donlin-Asp *et al.*, 2017). Los microfilamentos se encuentran en constante polimerización y despolimerización, siendo este fenómeno especialmente importante en etapas tempranas del desarrollo, puesto que permite una especial plasticidad del citoesqueleto, y en la función sináptica. De hecho, han sido descritas alteraciones en la reorganización de los filamentos de actina en cultivos de fibroblastos deficientes en SMN (Gabanella *et al.*, 2016) y se ha descrito una reducción de F-actina en la NMJ de ratones AME (Ackermann *et al.*, 2013). En nuestro estudio en el terminal presináptico motor demostramos que los granos de SMN coexisten con ARNm de β -actina, ribosomas y polirribosomas, elementos fundamentales para la síntesis proteica, durante la etapa postnatal. De hecho, la presencia de polirribosomas en el terminal presináptico sugiere fuertemente que la maquinaria de síntesis proteica está activa en este periodo. Sería de interés en futuras investigaciones profundizar en el conocimiento de esta maquinaria en la NMJ, así como estudiar transcritos relacionados con SMN y la maduración sináptica

como *GAP43* o *AChE* (Wang *et al.*, 2015; Lauria *et al.*, 2020), en condiciones normales y en un contexto de niveles bajos de SMN. Estos resultados refuerzan la hipótesis, planteada previamente en neuronas en cultivo, de que los granos de SMN participan en la síntesis local de proteínas.

1.3. Regulación temporal de la expresión de SMN

Nuestros resultados demuestran que el número de gránulos de Snn disminuye progresivamente en los axones y en los terminales presinápticos motores del músculo TVA tras la primera semana de vida postnatal, quedando solo una expresión residual en la edad adulta (Fig. 33). Previamente se había descrito, en concordancia con nuestros resultados, la presencia de granos de Snn a P4 en los terminales nerviosos motores del diafragma y su ausencia en la edad adulta (Dombert *et al.*, 2014), pero no el curso temporal de este proceso. La progresiva disminución de Snn en el terminal presináptico de los ratones silvestres pudiera deberse a una inhibición del transporte axonal de los granos, pero el hecho de que haya un descenso significativo del contenido de Snn en las motoneuronas espinales entre P5 y P15, medido mediante inmunotransferencia en ratones silvestres (Jablonka *et al.*, 2000), sugiere que el descenso también ocurre en el soma de las motoneuronas.

Además de en los axones, aparecen gránulos de Snn en las neuritas y en el cono de crecimiento en motoneuronas silvestres en cultivo (Dombert *et al.*, 2014), por lo que se ha propuesto que SMN también participa en el desarrollo y maduración de estas estructuras. De hecho, hay un menor crecimiento de las neuritas y del cono axónico en motoneuronas en cultivo procedentes de ratones deficientes en SMN (Jablonka *et al.*, 2007). En este sentido, la desaparición de SMN tras el periodo de maduración postnatal observada en nuestro estudio apoya fuertemente su rol en la maduración postnatal, especialmente en etapas tempranas.

Se desconoce si el patrón temporal de Snn varía entre terminales nerviosos de músculos con distinto grado de vulnerabilidad, tal y como ocurre con otras proteínas en el terminal. En este sentido, trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que durante el desarrollo postnatal de la NMJ existe una transición entre dos de las isoformas de sinaptotagmina (Syt) que actúan como sensor de calcio para la exocitosis en el terminal

presináptico motor. Durante el periodo postnatal de maduración de la NMJ Syt-1 se regula a la baja y Syt-2 al alza, siendo esta última la isoforma que se expresa tras este periodo. Fisiológicamente, la velocidad de este cambio varía temporalmente entre distintos músculos y correlaciona con la vulnerabilidad de la NMJ en los mismos (Tejero *et al.*, 2016, 2018). Es llamativo que esta transición coincida en los músculos vulnerables, como el TVA, con la regulación a la baja de Smn. Sería de interés, por tanto, estudiar si el patrón temporal de expresión de Smn varía entre músculos con distintas vulnerabilidades.

2. Impacto de la sobreexpresión de SMN y SMN Δ 7

Las alteraciones patológicas que la deficiencia de SMN genera en el organismo están ampliamente reconocidas y estudiadas. Sin embargo, las posibles afectaciones patológicas derivadas de su sobreexpresión se desconocen. El hecho de que SMN se exprese altamente durante el desarrollo y la maduración pero que se reduzca de forma drástica posteriormente plantea la cuestión de qué consecuencias puede tener el mantenimiento de su expresión por encima de los niveles fisiológicos. Este problema cobra especial relevancia teniendo en cuenta la estrategia terapéutica de incremento de los niveles de SMN, especialmente en el caso de terapia génica. A diferencia de los tratamientos aprobados dirigidos a aumentar la inclusión del exón 7 en el transcrito final de *SMN2*, sujetos a la regulación fisiológica de la transcripción del gen, con la terapia génica scAVV-SMN la proteína se sobreexpresa constitutivamente ya que depende del promotor CAG.

En el presente trabajo hemos comparado el contenido de granos de SMN en ratones silvestres y en el modelo SMN Δ 7 que contiene dos transgenes humanos (*SMN2* y *SMN Δ 7*). De ambos transgenes se esperaría un patrón de expresión similar al humano, ya que *SMN2* presenta su promotor fisiológico, casi idéntico al de *SMN1*, y *SMN Δ 7* un fragmento del promotor del gen humano *SMN1* (Echaniz-Laguna *et al.*, 1999; Le *et al.*, 2005). Sin embargo, nuestros resultados muestran sobreexpresión persistente de granos de SMN en comparación con los ratones silvestres durante la segunda semana postnatal, por lo que la diferencia en la expresión de SMN en ambas líneas puede deberse a una regulación diferencial de la transcripción del gen murino y los transgenes. Otra cuestión de interés es si los granos de SMN en los modelos SMN Δ 7 y taiwanés contienen, además

de proteína completa, proteína truncada puesto que el anticuerpo empleado puede reconocer otras formas de SMN distintas de la proteína completa.

Las consecuencias de la sobreexpresión persistente de las proteínas SMN y SMN Δ 7 en AME son aún poco conocidas, aunque empiezan a aparecer algunos estudios. Una investigación en cerdos y primates no humanos ha descrito la aparición de patología neurosensorial asociada a la aplicación de este tipo de terapias (Hinderer *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha reportado un potencial efecto deletéreo de SMN Δ 7. Por ejemplo, un estudio de los niveles del ARNm *SMN17* en cultivos de células linfoblastoides humanas procedente de pacientes AME tipo I-III mostró una correlación directa entre los niveles del transcrito y la severidad de la patología (Gavrilov *et al.*, 1998). En la misma línea, otros grupos han observado que SMN Δ 7 es proapoptótica cuando se expresa a niveles muy altos en una célula y, por tanto, le atribuyen un efecto deletéreo en la AME (Kerr *et al.*, 2000; Vyas *et al.*, 2002). Así mismo, en un modelo murino de apoptosis neuronal inducida por virus, la sobreexpresión de SMN Δ 7 disminuye la supervivencia (Kerr *et al.*, 2000). En este mismo estudio, la sobreexpresión de SMN produce el efecto opuesto, aumenta la supervivencia. Por otro lado, estudios en cultivos celulares e *in vivo* en un modelo de ratón han mostrado que la sobreexpresión de la proteína truncada tiene un efecto atenuante en la severidad de la patología (Wang & Dreyfuss, 2002; Le *et al.*, 2005). Aún se desconoce si este efecto se debe a una acción intrínseca de SMN Δ 7 o es secundaria a la formación de heteroligómeros FL- Δ 7 funcionales. No obstante, estos estudios solo contemplan una ventana temporal temprana que solo comprende 20-30 días postnatales. Es posible, por tanto, que el efecto paliativo se produzca durante las primeras etapas madurativas, cuando los requerimientos de SMN son muy elevados, pero posteriormente tenga un efecto tóxico. De hecho, de forma sorprendente, en nuestros experimentos hemos detectado acumulaciones axonales de NF no solo en los ratones AME, sino también en los ratones controles que sobreexpresan SMN (Fig. 48). En este sentido, Van Alstyne y colaboradores han descrito que los ratones controles del modelo SMN Δ 7 tratados con scAVV9-SMN desarrollan una patología sensorimotora con denervación de las NMJ (Van Alstyne *et al.*, 2021), lo que indica una posible toxicidad relacionada con la sobreexpresión de SMN.

Además, nuestros datos demuestran que en las acumulaciones axonales y presinápticas de NF, previamente bien documentadas en AME (Cifuentes-Díaz *et al.*, 2002; Kariya *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2009; Torres-Benito *et al.*, 2011), también se

acumulan granos de SMN (Fig. 47), lo que sugiere que el tráfico retrógrado y/o la degradación de SMN están comprometidos. En futuros trabajos sería de gran interés determinar el mecanismo subyacente a estos acúmulos de proteína. Los agregados de SMN han sido recientemente observados en el citoplasma de las motoneuronas espinales y de las neuronas sensoriales de ratones controles tratados con scAVV9-SMN, y por tanto, con sobreexpresión de la proteína (Van Alstyne *et al.*, 2021). Así mismo, se ha descrito el secuestro específico de SmB en los agregados, esencial para la formación de las snRNP, con su consecuente reducción en el núcleo. A nivel del sistema motor periférico, una cuestión relevante, por tanto, sería saber si en los acúmulos de SMN en el axón y en los terminales motores mutantes se produce un secuestro de mRNP o proteínas de relevancia para la función sináptica.

3. Alteraciones funcionales del terminal motor en la AME

Nuestros experimentos de imagen dinámica *ex vivo* en el modelo de AME Taiwanés-SypHy demuestran una disfunción significativa en la exo- y endocitosis y una dependencia reducida de la vía glicolítica para la obtención de energía metabólica en los terminales motores AME durante la actividad eléctrica. Estos resultados, junto con los aportados por otros autores, indican que los defectos de neurotransmisión en AME son el resultado de cambios interactivos en la energía, metabolismo, homeostasis del Ca^{2+} y proteínas sinápticas.

3.1. Afectación de la exo-endocitosis

Múltiples estudios han caracterizado las alteraciones funcionales del terminal motor en el modelo de AME SMN Δ 7. Sin embargo, hasta donde sabemos, solo hay un estudio en el modelo Taiwanés en el que se caracterizan electrofisiológicamente los terminales motores (Ackermann *et al.*, 2013). En este estudio, en concordancia con estudios previos en el modelo SMN Δ 7 y con nuestros resultados, se observó una reducción del contenido cuántico y un ensanchamiento del EPP con aumento del tiempo de subida y del tiempo de caída. Sin embargo, los valores de QC reportados en los ratones controles y AME son ligeramente inferiores a los observados en el presente trabajo. No obstante, hay que tener en cuenta varios aspectos para interpretar esta divergencia. Por un lado, el modelo

Taiwanés empleado por Ackermann y colaboradores presenta un trasfondo genético C57BL/6N, que modifica el fenotipo de los ratones incrementando su supervivencia media 5 días (15,6 días), respecto al trasfondo FVB/N presente en nuestro modelo (9,9 días; Fig. 59). Por otro lado, la edad a la que realizaron los experimentos fue a P14, 5-7 días más tarde que en nuestro trabajo. Aunque no sabemos con exactitud cómo estas dos variables impactan en el QC, la reducción relativa del QC en los terminales mutantes con respecto a los controles es prácticamente idéntica a la nuestra (~30 %), lo que sugiere una afectación similar.

Varios grupos han descrito una alteración de la endocitosis en contextos de deficiencia en SMN. Por ejemplo, se ha reportado una localización anómala de la intersectina y de la α -adaptina, esta última subunidad del complejo adaptador AP-2, en los terminales presinápticos de motoneuronas colinérgicas de *C. elegans* deficiente en *Smn* (Dimitriadi *et al.*, 2016). También se ha descrito la disminución en la actividad fosfatasa de la calcineurina en modelos de AME (Janzen *et al.*, 2018), lo que puede producir hiperfosforilación de proteínas implicadas en la endocitosis, como la dinamina 1. Así mismo, en estudios dinámicos de carga de sonda FITC-Dextrano en cultivos de fibroblastos de pacientes AME y de células NSC-34 deficientes en *Smn* se ha observado una menor endocitosis que en controles (Hosseinibarkooie *et al.*, 2016; Riessland *et al.*, 2017; Janzen *et al.*, 2018). Sin embargo, estos estudios dinámicos cuantifican la endocitosis constitutiva y no la endocitosis regulada. En nuestro estudio, hemos mostrado mediante registros de imagen en tiempo real de la actividad sináptica una menor endocitosis en la NMJ de ratones AME durante la actividad eléctrica. En línea con nuestros resultados, un estudio previo realizado en el mismo modelo mediante carga de sonda FM1-43 también reportó una menor endocitosis evocada (Hosseinibarkooie *et al.*, 2016). Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, la medición de la endocitosis se realizó tras la fijación del tejido y, por tanto, no evaluaba la dinámica de la endocitosis. En conjunto, nuestros resultados refuerzan la visión de una importante alteración del ciclo exo-endocítico y, por tanto, de la función de la NMJ en la AME.

3.2. Defectos en la homeostasis mitocondrial

En algunas enfermedades neurodegenerativas, la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial está involucrada en el estrés oxidativo y la activación de la caspasa 3. Sin embargo,

experimentos recientes de nuestro laboratorio han demostrado que las mitocondrias en los terminales motores de los ratones modelo de AME presentan una reducción en la capacidad de carga de Ca^{2+} durante la actividad eléctrica, sin que exista afectación en la capacidad de tamponamiento ni en la extrusión de Ca^{2+} desde la matriz mitocondrial (Lopez-Manzaneda *et al.*, 2021). Los resultados de este trabajo también mostraron que la disminución de la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria no se debe a la disminución del gradiente de concentración para este ion, posibilidad sustentada por la menor densidad de VGCC de tipo P/Q en los terminales nerviosos AME (Jablonka *et al.*, 2007; Tejero *et al.*, 2016, 2020).

En el presente trabajo, testamos la hipótesis de que la menor entrada de Ca^{2+} se debe a una alteración en el gradiente eléctrico. Si la acumulación de cargas positivas (Ca^{2+}) en la matriz no se equilibra adecuadamente mediante la extrusión de H^+ durante la actividad eléctrica, puede producirse la despolarización mitocondrial de la mitocondria. Un estudio previo *in vitro* ha propuesto que el Ψ_m en las motoneuronas de la AME está despolarizado en comparación con los controles (Miller *et al.*, 2016). Por el contrario, otro estudio, realizado en células NSC34 deficientes en Smn (Acsadi *et al.*, 2009), sugiere que se produce una hiperpolarización mitocondrial. Finalmente, en nuestro estudio, *ex vivo*, no encontramos alteraciones significativas en el $\Delta\Psi_m$, medido con rodamina-123, empleando el mismo protocolo de estimulación que López-Manzaneda en sus mediciones de Ca^{2+} libre mitocondrial (20 Hz, 100-200 AP) (Lopez-Manzaneda *et al.*, 2021). Sin embargo, estos resultados no descartan que las mitocondrias de la AME se despolaricen en etapas más avanzadas de la enfermedad.

Estos resultados, junto con los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio, indican que el menor nivel de Ca^{2+} libre mitocondrial durante la actividad eléctrica en los terminales AME es causado por una reducción intrínseca en la capacidad de entrada de Ca^{2+} mitocondrial. Curiosamente, la tasa de entrada de Ca^{2+} en las mitocondrias a través del canal MCU está regulada por su capacidad respiratoria (Nicholls & Chalmers, 2004), que está alterada en la AME (Acsadi *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2016). No obstante, si existen alteraciones en la densidad de los canales de MCU o en las proteínas asociadas son preguntas atractivas para futuros experimentos.

Por otro lado, podemos plantearnos cómo influye la disminución de Ca^{2+} mitocondrial en la función del terminal presináptico motor. En condiciones normales, la

producción de energía se adapta a las necesidades celulares y las mitocondrias juegan un papel esencial en ello (McCormack *et al.*, 1990; Jouaville *et al.*, 1999). Los bajos niveles de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial en AME durante la estimulación eléctrica pudieran afectar la adecuada activación las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) lo que disminuiría la capacidad de las mitocondrias para sintetizar ATP durante la actividad nerviosa repetitiva. Estos resultados están en línea con datos previos que muestran que la síntesis de ATP en mitocondrias AME está reducida (Acsadi *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2016), lo que no descarta que el defecto metabólico puede tener un origen multicausal. Teniendo en cuenta que el ciclo de las vesículas sinápticas es el principal consumidor de ATP en las sinapsis (Rangaraju *et al.*, 2014), en el presente trabajo proponemos que parte de los defectos en la exo- y endocitosis se deben a la baja capacidad de las mitocondrias de AME para aumentar la síntesis de ATP durante la actividad eléctrica.

3.3. Perspectiva terapéutica de los agonistas de los VGCC: GV-58

Las distintas terapias dirigidas a incrementar los niveles de SMN han supuesto un punto de inflexión en el tratamiento de la AME, con resultados verdaderamente esperanzadores en los ensayos clínicos. Sin embargo, la posibilidad de un inicio del tratamiento tardío, la presencia de efectos adversos que impidan su administración, así como su precio actualmente prohibitivo, hace necesario el desarrollo de nuevas terapias complementarias que puedan modular la severidad de los síntomas e incrementar la calidad de vida de los pacientes. La administración de fármacos potenciadores de la neurotransmisión es una de las estrategias complementarias más prometedoras en este sentido.

Estudios previos con R-roscovitina, un inhibidor de Cdk5 y agonista de los VGCC, han demostrado efectividad para incrementar el QC en músculos vulnerables *ex vivo* de ratones a P9-11 del modelo SMN Δ 7 (Tejero *et al.*, 2020). Con la aplicación de R-roscovitina 100 μM se consiguió un incremento del 280-290 % en el QC. Sin embargo, concentraciones menores de droga no fueron eficaces. Así mismo, estos estudios han reportado que la administración de este compuesto durante la gestación incrementa la supervivencia de los ratones AME (Tejero *et al.*, 2020). En nuestros experimentos, por el contrario, la aplicación de 20 μM de GV-58, un análogo de la R-roscovitina sin actividad sobre Cdk5, no aumentó la amplitud del EPP. Sin embargo, provocó un incremento de la liberación asincrónica con el subsiguiente aumento de la duración del EPP, en

consonancia con estudios *in vitro* que muestran un efecto más potente sobre los VGCC que la R-roscovitina (Tarr *et al.*, 2013). Sería, por tanto, de interés para futuros experimentos evaluar el efecto de GV-58 sobre el EPP a concentraciones mayores. Así mismo, en experimentos *ex vivo* ratones adultos con síndrome de Lambert-Eaton inducido, la aplicación conjunta de GV-58 y 3,4-DAP, un inhibidor de los canales de K, resulta en la recuperación completa de la liberación de neurotransmisor (Tarr *et al.*, 2014). Este síndrome es producto de la destrucción por auto-anticuerpos de los VGCC tipo P/Q. En la AME se ha descrito una disminución en la densidad de estos canales (Tejero *et al.*, 2016, 2020), por lo que en futuros estudios sería de interés la evaluación de terapias combinadas con este o con otros moduladores de los canales de calcio.

Conclusiones

1. Los axones y los terminales nerviosos motores contienen gránulos de SMN que se distribuyen de forma ordenada y con patrones específicos en ambas estructuras.
2. Los gránulos de SMN están asociados al citoesqueleto, especialmente a los NF, tanto en los terminales de ratones silvestres, como en los modelos de AME (taiwanés y SMN Δ 7).
3. En los ratones silvestres, el número de gránulos de Smn en los axones y en los terminales presinápticos disminuye progresivamente durante las dos primeras semanas de vida hasta hacerse imperceptibles en la edad adulta, lo que sugiere que Smn desempeña un papel importante en estos compartimentos durante la maduración postnatal de la NMJ.
4. Durante la etapa de maduración sináptica los gránulos de SMN coexisten en el terminal motor con dos de los elementos de la maquinaria de síntesis proteica, como son ribosomas y ARNm de β -actina. Estos resultados refuerzan la hipótesis planteada previamente *in vitro* de que los granos de SMN participan en la síntesis local de proteínas.
5. La expresión heteróloga de la proteína SMN en los ratones transgénicos modelos de AME no desaparece durante las primeras semanas de vida, como ocurre con la proteína endógena murina.
6. La sobreexpresión de SMN en los modelos de AME da lugar a depósitos de SMN en el terminal presináptico y en los axones lo que, junto con la acumulación de los NF, puede producir interrupción del tráfico axonal, disfunción neuronal y neurodegeneración.
7. La disminución de los niveles de proteína SMN completa produce múltiples alteraciones funcionales en el terminal nervioso motor que van desde disminución de la liberación de neurotransmisor hasta alteraciones en el reciclado de las vesículas sinápticas.
8. La actividad mitocondrial es crítica para el mantenimiento de la exocitosis y el reciclado de las vesículas sinápticas, tanto en controles como en mutantes. Sin embargo, la producción de ATP por la vía glucolítica no juega un papel importante en esta sinapsis.
9. GV-58, compuesto derivado de la R-roscovitina que prolonga el tiempo de apertura de los canales de calcio dependientes de potencial tipo 2 (Cav2), aumenta la liberación de neurotransmisor en terminales nerviosos motores de ratones controles y modelo de AME durante el periodo postnatal temprano, lo que sugiere que este compuesto podría ser un candidato idóneo para complementar los tratamientos actuales de la AME dirigidos a

aumentar la expresión de SMN. Así mismo, GV-58 pudiera ser de utilidad en otras enfermedades neuromusculares en las que se requiera un aumento de la neurotransmisión.

Conclusions

- 1.** Motor axons and nerve terminals contain granules of SMN that are distributed in an orderly manner and with specific patterns at both structures.
- 2.** SMN granules are associated with the cytoskeleton, especially with NF, in nerve terminals from wild-type mice and SMA mouse models (Taiwanese and SMN Δ 7).
- 3.** In wild-type mice, the number of Smn granules in axons and presynaptic terminals progressively decreases during the first two postnatal weeks until it becomes unnoticeable in adulthood, suggesting that Smn plays an important role in these compartments during postnatal maturation of the NMJ.
- 4.** During synaptic maturation, SMN granules coexist in the motor terminal with two elements of the protein synthesis machinery, such as ribosomes and β -actin mRNA. These results reinforce the hypothesis previously raised *in vitro* that SMN granules participate in local protein synthesis.
- 5.** The heterologous expression of the SMN protein in SMA transgenic mice does not disappear during the first weeks of life, as occurs with the murine endogenous protein.
- 6.** SMN overexpression in SMA models leads to SMN deposits in axons and presynaptic terminals, which, together with NF accumulation, may produce pathological disruption of axonal trafficking, neuronal dysfunction, and neurodegeneration.
- 7.** The decrease in full-length SMN protein levels produces multiple functional alterations in the motor nerve terminal, ranging from decreased neurotransmitter release to alterations in the recycling of synaptic vesicles.
- 8.** Mitochondrial activity is critical for exocytosis and recycling of synaptic vesicles maintenance, both in controls and SMA mice. However, ATP production via the glycolytic pathway does not play an important role at this synapse.
- 9.** GV-58, a compound developed from R-roscovitine that prolongs the opening time of voltage-dependent calcium channels type 2 (Cav2), increases neurotransmitter release in motor nerve terminals in control and SMA model mice during the early postnatal period, suggesting that this compound could be a suitable candidate to complement current SMA treatments aimed to increase SMN expression. Likewise, GV-58 could be useful in other neuromuscular diseases in which an increase in neurotransmission is required.

Bibliografía

- Ackermann, B., Kröber, S., Torres-benito, L., Borgmann, A., Peters, M., Hosseinibarkooie, S., Tejero, R., Jakubik, M., Schreml, J., Milbradt, J., Wunderlich, T.F., Riessland, M., Tabares, L., & Wirth, B. (2013) Plastin 3 ameliorates spinal muscular atrophy via delayed axon pruning and improves neuromuscular junction functionality. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 1328–1347.
- Acsadi, G., Lee, I., Li, X., Khaidakov, M., Pecinova, A., Parker, G.C., & Hüttemann, M. (2009) Mitochondrial dysfunction in a neural cell model of spinal muscular atrophy. *J. Neurosci. Res.*, **87**, 2748–2756.
- Akten, B., Kye, M.J., Hao, L.T., Wertz, M.H., Singh, S., Nie, D., Huang, J., Merianda, T.T., Twiss, J.L., Beattie, C.E., Steen, J.A.J., & Sahin, M. (2011) Interaction of survival of motor neuron (SMN) and HuD proteins with mRNA cpg15 rescues motor neuron axonal deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 10337–10342.
- Anderson, K.D., Merhege, M.A., Morin, M., Bolognani, F., & Perrone-Bizzozero, N.I. (2003) Increased expression and localization of the RNA-binding protein HuD and GAP-43 mRNA to cytoplasmic granules in DRG neurons during nerve regeneration. *Exp. Neurol.*, **183**, 100–108.
- Arnold, W.D., Kassar, D., & Kissel, J.T. (2015) Spinal muscular atrophy: Diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle and Nerve*, **51**, 157–167.
- Arumugam, S., Garcera, A., Soler, R.M., & Tabares, L. (2017) Smn-deficiency increases the intrinsic excitability of motoneurons. *Front. Cell. Neurosci.*, **11**, 1–13.
- Baccon, J., Pellizzoni, L., Rappsilber, J., Mann, M., & Dreyfuss, G. (2002) Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J. Biol. Chem.*, **277**, 31957–31962.
- Baranello, G., Darras, B.T., Day, J.W., Deconinck, N., Klein, A., Masson, R., Mercuri, E., Rose, K., El-Khairi, M., Gerber, M., Gorni, K., Khwaja, O., Kletzl, H., Scalco, R.S., Seabrook, T., Fontoura, P., & Servais, L. (2021) Risdiplam in Type 1 Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.*, **384**, 915–923.
- Berciano, M.T., Castillo-Iglesias, M.S., Val-Bernal, J.F., Lafarga, V., Rodriguez-Rey, J.C., Lafarga, M., & Tapia, O. (2020) Mislocalization of SMN from the I-band and M-band in human skeletal myofibers in spinal muscular atrophy associates with primary structural alterations of the sarcomere. *Cell Tissue Res.*, **381**, 461–478.
- Bernabò, P., Tebaldi, T., Groen, E.J.N., Lane, F.M., Perenthaler, E., Mattedi, F., Newbery, H.J., Zhou, H., Zuccotti, P., Potrich, V., Shorrock, H.K., Muntoni, F., Quattrone, A., Gillingwater, T.H., & Viero, G. (2017) In Vivo Translatome Profiling in Spinal Muscular Atrophy Reveals a Role for SMN Protein in Ribosome Biology. *Cell Rep.*, **21**, 953–965.
- Bertrand, S., Burlet, P., Clermont, O., Huber, C., Fondrat, C., Thierry-Mieg, D., Munnich, A., & Lefebvre, S. (1999) The RNA-binding properties of SMN: Deletion analysis of the zebrafish orthologue defines domains conserved in evolution. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 775–782.
- Bevan, A.K., Hutchinson, K.R., Foust, K.D., Braun, L., McGovern, V.L., Schmelzer, L., Ward, J.G., Petruska, J.C., Lucchesi, P.A., Burghes, A.H.M., & Kaspar, B.K. (2010) Early heart failure in the SMN Δ 7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3895–3905.

- Blokhuis, A.M., Koppers, M., Groen, E.J.N., van den Heuvel, D.M.A., Dini Modigliani, S., Anink, J.J., Fumoto, K., van Diggelen, F., Snelting, A., Soodaar, P., Verheijen, B.M., Demmers, J.A.A., Veldink, J.H., Aronica, E., Bozzoni, I., den Hertog, J., van den Berg, L.H., & Pasterkamp, R.J. (2016) Comparative interactomics analysis of different ALS-associated proteins identifies converging molecular pathways. *Acta Neuropathol.*, **132**, 175–196.
- Boido, M., de Amicis, E., Valsecchi, V., Trevisan, M., Ala, U., Ruegg, M.A., Hettwer, S., & Vercelli, A. (2018) Increasing agrin function antagonizes muscle atrophy and motor impairment in spinal muscular atrophy. *Front. Cell. Neurosci.*, **12**, 1–14.
- Boisvert, F.-M., Cote, J., Boulanger, M.-C., Cleroux, P., Bachand, F., Autexier, C., & Richard, S. (2002) Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.*, **159**, 957–969.
- Bonasio, R., Lecona, E., & Reinberg, D. (2010) MBT domain proteins in development and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **21**, 221–230.
- Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M.F., & Masurier, C. (2010) Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Hum. Gene Ther.*, **21**, 704–712.
- Bowerman, M., Swoboda, K.J., Michalski, J.-P., Wang, G.-S., Reeks, C., Beauvais, A., Murphy, K., Woulfe, J., Screaton, R.A., Scott, F.W., & Kothary, R. (2012) Glucose metabolism and pancreatic defects in spinal muscular atrophy. *Ann. Neurol.*, **72**, 256–268.
- Boyd, I.A. & Martin, A.R. (1955) The quantal composition of the mammalian end-plate potential. *J. Physiol.*, **129**, 14–5P.
- Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U., & Lührmann, R. (2001) Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA*, **7**, 1531–1542.
- Braun, S., Warter, J.M., Poindron, P., Croizat, B., & Lagrange, M.C. (1995) Constitutive muscular abnormalities in culture in spinal muscular atrophy. *Lancet*, **345**, 694–695.
- Brzustowicz, L.M., Lehner, T., Castilla, L.H., Penchaszadeh, G.K., Wilhelmsen, K.C., Daniels, R., Davies, K.E., Leppert, M., Ziter, F., & Wood, D. (1990) Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature*, **344**, 540–541.
- Buhler, D., Raker, V., Lührmann, R., & Fischer, U. (1999) Essential Role for the Tudor Domain of SMN in Spliceosomal U snRNP Assembly: Implications for Spinal Muscular Atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 2351–2357.
- Burghes, A.H.M. & Beattie, C.E. (2009) Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**, 597–609.
- Bürglen, L., Lefebvre, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Cruaud, C., Munnich, A., & Melki, J. (1996) Structure and organization of the human survival motor neuron

- (SMN) gene. *Genomics*, **32**, 479–482.
- Burlet, P., Huber, C., Bertrand, S., Ludosky, M.A., Zwaenepoel, I., Clermont, O., Roume, J., Delezoide, A.L., Cartaud, J., Munnich, A., & Lefebvre, S. (1998) The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 1927–1933.
- Burnett, B.G., Muñoz, E., Tandon, A., Kwon, D.Y., Sumner, C.J., & Fischbeck, K.H. (2009) Regulation of SMN protein stability. *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 1107–1115.
- Butchbach, M.E.R. (2016) Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. *Front. Mol. Biosci.*, **3**, 7.
- Cano, R. (2014) Different Modes of Synaptic Vesicle Recycling un Synaptophysin-pHluorin Transgenic Mouse Motor Nerve Terminals. Universidad de Sevilla.
- Carissimi, C., Baccon, J., Straccia, M., Chiarella, P., Maiolica, A., Sawyer, A., Rappsilber, J., & Pellizzoni, L. (2005) Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. *FEBS Lett.*, **579**, 2348–2354.
- Carissimi, C., Saieva, L., Baccon, J., Chiarella, P., Maiolica, A., Sawyer, A., Rappsilber, J., & Pellizzoni, L. (2006) Gemin8 is a novel component of the survival motor neuron complex and functions in small nuclear ribonucleoprotein assembly. *J. Biol. Chem.*, **281**, 8126–8134.
- Cauchi, R.J. (2010) SMN and Gemins: “We are family” ... or are we?: Insights into the partnership between Gemins and the spinal muscular atrophy disease protein SMN. *BioEssays*, **32**, 1077–1089.
- Chari, A., Golas, M.M., Klingenhäger, M., Neuenkirchen, N., Sander, B., Englbrecht, C., Sickmann, A., Stark, H., & Fischer, U. (2008) An Assembly Chaperone Collaborates with the SMN Complex to Generate Spliceosomal SnRNPs. *Cell*, **135**, 497–509.
- Charroux, B., Pellizzoni, L., Parkinson, R.A., Shevchenko, A., Mann, M., & Dreyfuss, G. (1999) Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J. Cell Biol.*, **147**, 1181–1193.
- Charroux, B., Pellizzoni, L., Parkinson, R.A., Yong, J., Shevchenko, A., Mann, M., & Dreyfuss, G. (2000) Gemin4: A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J. Cell Biol.*, **148**, 1177–1186.
- Cho, S. & Dreyfuss, G. (2010) A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev.*, **24**, 438–442.
- Cho, S. & Meriney, S.D. (2006) The effects of presynaptic calcium channel modulation by roscovitine on transmitter release at the adult frog neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.*, **23**, 3200–3208.
- Cifuentes-Diaz, C., Nicole, S., Velasco, M.E., Borra-Cebrian, C., Panozzo, C., Frugier, T., Millet, G., Roblot, N., Joshi, V., & Melki, J. (2002) Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1439–1447.
- Cingolani, L.A. & Goda, Y. (2008) Actin in action: The interplay between the actin

- cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat. Rev. Neurosci.*, **9**, 344–356.
- Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Salani, S., Ronchi, D., Saladino, F., Bordoni, A., Fortunato, F., Del Bo, R., Papadimitriou, D., Locatelli, F., Menozzi, G., Strazzer, S., Bresolin, N., & Comi, G.P. (2008) Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.*, **118**, 3316–3330.
- Corti, S., Nizzardo, M., Simone, C., Falcone, M., Nardini, M., Ronchi, D., Donadoni, C., Salani, S., Riboldi, G., Magri, F., Menozzi, G., Bonaglia, C., Rizzo, F., Bresolin, N., & Comi, G.P. (2012) Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy. *Sci. Transl. Med.*, **4**, 1–32.
- Crawford, T.O. & Pardo, C.A. (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.*, **3**, 97–110.
- D’Amico, A., Mercuri, E., Tiziano, F.D., & Bertini, E. (2011) Spinal muscular atrophy. *Orphanet J. Rare Dis.*, **6**, 71.
- de la Fuente, S., Sansa, A., Periyakaruppiyah, A., Garcera, A., & Soler, R.M. (2019) Calpain Inhibition Increases SMN Protein in Spinal Cord Motoneurons and Ameliorates the Spinal Muscular Atrophy Phenotype in Mice. *Mol. Neurobiol.*, **56**, 4414–4427.
- Deguisse, M.O., Baranello, G., Mastella, C., Beauvais, A., Michaud, J., Leone, A., De Amicis, R., Battezzati, A., Dunham, C., Selby, K., Warman Chardon, J., McMillan, H.J., Huang, Y.T., Courtney, N.L., Mole, A.J., Kubinski, S., Claus, P., Murray, L.M., Bowerman, M., Gillingwater, T.H., Bertoli, S., Parson, S.H., & Kothary, R. (2019) Abnormal fatty acid metabolism is a core component of spinal muscular atrophy. *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, **6**, 1519–1532.
- Del Castillo, J. & Katz, B. (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol.*, **124**, 560–573.
- Dhillon, S. (2020) Risdiplam: First Approval. *Drugs*, **80**, 1853–1858.
- Di Liegro, C.M., Schiera, G., & Di Liegro, I. (2014) Regulation of mRNA transport, localization and translation in the nervous system of mammals (Review). *Int. J. Mol. Med.*, **33**, 747–762.
- Dimitriadi, M., Derdowski, A., Kallou, G., Maginnis, M.S., O’hern, P., Bliska, B., Sorkaç, A., Nguyen, K.C.Q., Cook, S.J., Poulgiannis, G., Atwood, W.J., Hall, D.H., & Hart, A.C. (2016) Decreased function of survival motor neuron protein impairs endocytic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **113**, E4377–E4386.
- Dombert, B., Sivadasan, R., Simon, C.M., Jablonka, S., & Sendtner, M. (2014) Presynaptic localization of Smn and hnRNP R in axon terminals of embryonic and postnatal mouse motoneurons. *PLoS One*, **9**, e110846.
- Donlin-Asp, P.G., Bassell, G.J., & Rossoll, W. (2016) A role for the survival of motor neuron protein in mRNP assembly and transport. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **39**, 53–61.
- Donlin-Asp, P.G., Fallini, C., Campos, J., Chou, C.C., Merritt, M.E., Phan, H.C., Bassell, G.J., & Rossoll, W. (2017) The Survival of Motor Neuron Protein Acts as a Molecular Chaperone for mRNP Assembly. *Cell Rep.*, **18**, 1660–1673.

- Donnelly, C.J., Park, M., Spillane, M., Yoo, S., Pacheco, A., Gomes, C., Vuppalanchi, D., McDonald, M., Kim, H.K., Merianda, T.T., Gallo, G., & Twiss, J.L. (2013) Axonally synthesized β -actin and GAP-43 proteins support distinct modes of axonal growth. *J. Neurosci.*, **33**, 3311–3322.
- Dubowitz, V. (1999) Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): An expanding clinical phenotype. *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, **3**, 49–51.
- Duque, S.I., Arnold, W.D., Odermatt, P., Li, X., Porensky, P.N., Schmelzer, L., Meyer, K., Kolb, S.J., Schümperli, D., Kaspar, B.K., & Burghes, A.H.M. (2015) A large animal model of spinal muscular atrophy and correction of phenotype. *Ann. Neurol.*, **77**, 399–414.
- Dyer, O. (2020) Health ministers condemn Novartis lottery for Zolgensma, the world's most expensive drug. *BMJ*, **368**, m580.
- Echaniz-Laguna, A., Miniou, P., Bartholdi, D., & Melki, J. (1999) The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements. *Am. J. Hum. Genet.*, **64**, 1365–1370.
- Espinosa-Cantú, A., Cruz-Bonilla, E., Noda-Garcia, L., & DeLuna, A. (2020) Multiple Forms of Multifunctional Proteins in Health and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 1–10.
- Fallini, C., Bassell, G.J., & Rossoll, W. (2010) High-efficiency transfection of cultured primary motor neurons to study protein localization, trafficking, and function. *Mol. Neurodegener.*, **5**, 17.
- Fallini, C., Donlin-Asp, P.G., Rouanet, J.P., Bassell, G.J., & Rossoll, W. (2016) Deficiency of the Survival of Motor Neuron Protein Impairs mRNA Localization and Local Translation in the Growth Cone of Motor Neurons. *J. Neurosci.*, **36**, 3811–3820.
- Fallini, C., Rouanet, J.P., Donlin-Asp, P.G., Guo, P., Zhang, H., Singer, R.H., Rossoll, W., & Bassell, G.J. (2014) Dynamics of survival of motor neuron (SMN) protein interaction with the mRNA-binding protein IMP1 facilitates its trafficking into motor neuron axons. *Dev. Neurobiol.*, **74**, 319–332.
- Fallini, C., Zhang, H., Su, Y., Silani, V., Singer, R.H., Rossoll, W., & Bassell, G.J. (2011) The survival of motor neuron (SMN) protein interacts with the mRNA-binding protein HuD and regulates localization of poly(A) mRNA in primary motor neuron axons. *J. Neurosci.*, **31**, 3914–3925.
- Finkel, R.S., Mercuri, E., Darras, B.T., Connolly, A.M., Kuntz, N.L., Kirschner, J., Chiriboga, C.A., Saito, K., Servais, L., Tizzano, E., Topaloglu, H., Tulinius, M., Montes, J., Glanzman, A.M., Bishop, K., Zhong, Z.J., Gheuens, S., Bennett, C.F., Schneider, E., Farwell, W., & De Vivo, D.C. (2017) Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.*, **377**, 1723–1732.
- Fischer, U., Englbrecht, C., & Chari, A. (2011) Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **2**, 718–731.
- Fischer, U., Liu, Q., & Dreyfuss, G. (1997) The SMN–SIP1 Complex Has an Essential Role in Spliceosomal snRNP Biogenesis. *Cell*, **90**, 1023–1029.

- Fletcher, E. V., Simon, C.M., Pagiazitis, J.G., Chalif, J.I., Vukojcic, A., Drobac, E., Wang, X., & Mentis, G.Z. (2017) Reduced sensory synaptic excitation impairs motor neuron function via Kv2.1 in spinal muscular atrophy. *Nat. Neurosci.*, **20**, 905–916.
- Foust, K.D., Wang, X., McGovern, V.L., Braun, L., Bevan, A.K., Haidet, A.M., Le, T.T., Morales, P.R., Rich, M.M., Burghes, A.H.M., & Kaspar, B.K. (2010) Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat. Biotechnol.*, **28**, 271–274.
- Friesen, W.J. & Dreyfuss, G. (2000) Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN). *J. Biol. Chem.*, **275**, 26370–26375.
- Friesen, W.J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A., & Dreyfuss, G. (2001) SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol. Cell*, **7**, 1111–1117.
- Friesen, W.J., Paushkin, S., Wyce, A., Massenet, S., Pesiridis, G.S., Van Duyne, G., Rappsilber, J., Mann, M., & Dreyfuss, G. (2001) The Methylosome, a 20S Complex Containing JBP1 and pICln, Produces Dimethylarginine-Modified Sm Proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 8289–8300.
- Fu, Y., Shen, X., Wu, H., Chen, D., & Zhou, C. (2019) Preimplantation genetic testing for monogenic disease of spinal muscular atrophy by multiple displacement amplification: 11 unaffected livebirths. *Int. J. Med. Sci.*, **16**, 1313–1319.
- Fujino, T., Lee, W.C.A., & Nedivi, E. (2003) Regulation of cpg15 by signaling pathways that mediate synaptic plasticity. *Mol. Cell. Neurosci.*, **24**, 538–554.
- Fujino, T., Leslie, J.H., Eavri, R., Chen, J.L., Lin, W.C., Flanders, G.H., Borok, E., Horvath, T.L., & Nedivi, E. (2011) CPG15 regulates synapse stability in the developing and adult brain. *Genes Dev.*, **25**, 2674–2685.
- Fujiwara, Y., Kasashima, K., Saito, K., Fukuda, M., Fukao, A., Sasano, Y., Inoue, K., Fujiwara, T., & Sakamoto, H. (2011) Microtubule association of a neuronal RNA-binding protein HuD through its binding to the light chain of MAP1B. *Biochimie*, **93**, 817–822.
- Gabanella, F., Butchbach, M.E.R., Saieva, L., Carissimi, C., Burghes, A.H.M., & Pellizzoni, L. (2007) Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One*, **2**, e921.
- Gabanella, F., Carissimi, C., Usiello, A., & Pellizzoni, L. (2005) The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 3629–3642.
- Gabanella, F., Pisani, C., Borreca, A., Farioli-Vecchioli, S., Ciotti, M.T., Ingegnere, T., Onori, A., Ammassari-Teule, M., Corbi, N., Canu, N., Monaco, L., Passananti, C., & Di Certo, M.G. (2016) SMN affects membrane remodelling and anchoring of the protein synthesis machinery. *J. Cell Sci.*, **129**, 804–816.
- Gallotta, I., Mazzarella, N., Donato, A., Esposito, A., Chaplin, J.C., Castro, S., Zampi, G., Battaglia, G.S., Hilliard, M.A., Bazzicalupo, P., & Di Schiavi, E. (2016) Neuron-

- specific knock-down of SMN1 causes neuron degeneration and death through an apoptotic mechanism. *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 2564–2577.
- Gangwani, L., Flavell, R.A., & Davis, R.J. (2005) ZPR1 Is Essential for Survival and Is Required for Localization of the Survival Motor Neurons (SMN) Protein to Cajal Bodies. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 2744–2756.
- Gangwani, L., Mikrut, M., Theroux, S., Sharma, M., & Davis, R.J. (2001) Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 376–383.
- Garcera, A., Bahi, N., Periyakarupiah, A., Arumugam, S., & Soler, R.M. (2013) Survival motor neuron protein reduction deregulates autophagy in spinal cord motoneurons in vitro. *Cell Death Dis.*, **4**, e686.
- Gavrilina, T.O., McGovern, V.L., Workman, E., Crawford, T.O., Gogliotti, R.G., Didonato, C.J., Monani, U.R., Morris, G.E., & Burghes, A.H.M. (2008) Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 1063–1075.
- Genabai, N.K., Ahmad, S., Zhang, Z., Jiang, X., Gabaldon, C.A., & Gangwani, L. (2015) Genetic inhibition of JNK3 ameliorates spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 6986–7004.
- Gerencser, A.A., Chinopoulos, C., Birket, M.J., Jastroch, M., Vitelli, C., Nicholls, D.G., & Brand, M.D. (2012) Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: Calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J. Physiol.*, **590**, 2845–2871.
- Giesemann, T., Rathke-Hartlieb, S., Rothkegel, M., Bartsch, J.W., Buchmeier, S., Jockusch, B.M., & Jockusch, H. (1999) A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with SMN in nuclear gems. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37908–37914.
- Giuditta, A., Jong, T.C., Eyman, M., Cefaliello, C., Bruno, A.P., & Crispino, M. (2008) Local gene expression in axons and nerve endings: The glia-neuron unit. *Physiol. Rev.*, **88**, 515–555.
- Glinka, M., Herrmann, T., Funk, N., Havlicek, S., Rossoll, W., Winkler, C., & Sendtner, M. (2010) The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-R is necessary for axonal β -actin mRNA translocation in spinal motor neurons. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 1951–1966.
- Godena, V.K., Romano, G., Romano, M., Appocher, C., Klima, R., Buratti, E., Baralle, F.E., & Feigin, F. (2011) TDP-43 regulates drosophila neuromuscular junctions growth by modulating futsch/MAP1B levels and synaptic microtubules organization. *PLoS One*, **6**.
- Gogliotti, R.G., Quinlan, K.A., Barlow, C.B., Heier, C.R., Heckman, C.J., & DiDonato, C.J. (2012) Motor neuron rescue in spinal muscular atrophy mice demonstrates that sensory-motor defects are a consequence, not a cause, of motor neuron dysfunction. *J. Neurosci.*, **32**, 3818–3829.
- Gonsalvez, G.B., Tian, L., Ospina, J.K., Boisvert, F.M., Lamond, A.I., & Matera, A.G.

- (2007) Two distinct arginine methyltransferases are required for biogenesis of Sm-class ribonucleoproteins. *J. Cell Biol.*, **178**, 733–740.
- Gray, K.M., Kaifer, K.A., Baillat, D., Wen, Y., Bonacci, T.R., Ebert, A.D., Raimer, A.C., Spring, A.M., Have, S. ten, Glascock, J.J., Gupta, K., Van Duyne, G.D., Emanuele, M.J., Lamond, A.I., Wagner, E.J., Lorson, C.L., & Matera, A.G. (2018) Self-oligomerization regulates stability of survival motor neuron protein isoforms by sequestering an SCF Slmb degraon . *Mol. Biol. Cell*, **29**, 96–110.
- Gribling-Burrer, A.-S., Leichter, M., Wurth, L., Huttin, A., Schlotter, F., Troffer-Charlier, N., Cura, V., Barkats, M., Cavarelli, J., Massenet, S., & Allmang, C. (2017) SECIS-binding protein 2 interacts with the SMN complex and the methylosome for selenoprotein mRNP assembly and translation. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 5399-5413.
- Groen, E.J.N., Perenthaler, E., Courtney, N.L., Jordan, C.Y., Shorrocks, H.K., Van der Hoorn, D., Huang, Y.T., Murray, L.M., Viero, G., & Gillingwater, T.H. (2018) Temporal and tissue-specific variability of SMN protein levels in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **27**, 2851–2862.
- Gruss, O.J., Meduri, R., Schilling, M., & Fischer, U. (2017) UsnRNP biogenesis: mechanisms and regulation. *Chromosoma*, **126**, 577–593.
- Gubitz, A.K., Mourelatos, Z., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., & Dreyfuss, G. (2002) Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J. Biol. Chem.*, **277**, 5631–5636.
- Hagenacker, T., Wurster, C.D., Günther, R., Schreiber-Katz, O., Osmanovic, A., Petri, S., Weiler, M., Ziegler, A., Kuttler, J., Koch, J.C., Schneider, I., Wunderlich, G., Schloss, N., Lehmann, H.C., Cordts, I., Deschauer, M., Lingor, P., Kamm, C., Stolte, B., Pietruck, L., Totzeck, A., Kizina, K., Mönninghoff, C., von Velsen, O., Ose, C., Reichmann, H., Forsting, M., Pechmann, A., Kirschner, J., Ludolph, A.C., Hermann, A., & Kleinschmitz, C. (2020) Nusinersen in adults with 5q spinal muscular atrophy: a non-interventional, multicentre, observational cohort study. *Lancet Neurol.*, **19**, 317–325.
- Hao, L.T., Duy, P.Q., An, M., Talbot, J., Iyer, C.C., Wolman, M., & Beattie, C.E. (2017) HuD and the survival motor neuron protein interact in motoneurons and are essential for motoneuron development, function, and mRNA regulation. *J. Neurosci.*, **37**, 11559–11571.
- Hao, L.T., Duy, P.Q., Jontes, J.D., Wolman, M., Granato, M., & Beattie, C.E. (2013) Temporal requirement for SMN in motoneuron development. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 2612–2625.
- Hao, L.T., Fuller, H.R., Lam, L.T., Le, T.T., Burghes, A.H.M., & Morris, G.E. (2007) Absence of gemin5 from SMN complexes in nuclear Cajal bodies. *BMC Cell Biol.*, **8**, 1–16.
- Hebert, M.D., Szymczyk, P.W., Shpargel, K.B., & Matera, A.G. (2001) Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev.*, **15**, 2720–2729.
- Heidelberger, R. (2001) ATP is required at an early step in compensatory endocytosis in synaptic terminals. *J. Neurosci.*, **21**, 6467–6474.

- Hensel, N. & Claus, P. (2017) The Actin Cytoskeleton in SMA and ALS: How Does It Contribute to Motoneuron Degeneration? *Neurosci.*, **24**, 54-72.
- Hinderer, C., Katz, N., Buza, E.L., Dyer, C., Goode, T., Bell, P., Richman, L.K., & Wilson, J.M. (2018) Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Hum. Gene Ther.*, **29**, 285–298.
- HosseiniBarkooie, S., Peters, M., Torres-Benito, L., Rastetter, R.H., Hupperich, K., Hoffmann, A., Mendoza-Ferreira, N., Kaczmarek, A., Janzen, E., Milbradt, J., Lamkemeyer, T., Rigo, F., Bennett, C.F., Guschlbauer, C., Büschges, A., Hammerschmidt, M., Riessland, M., Kye, M.J., Clemen, C.S., & Wirth, B. (2016) The Power of Human Protective Modifiers: PLS3 and CORO1C Unravel Impaired Endocytosis in Spinal Muscular Atrophy and Rescue SMA Phenotype. *Am. J. Hum. Genet.*, 1–19.
- Howell, M.D., Singh, N.N., & Singh, R.N. (2014) Advances in therapeutic development for spinal muscular atrophy. *Future Med. Chem.*, **6**, 1081–1099.
- Hsieh-Li, H.M., Chang, J.G., Jong, Y.J., Wu, M.H., Wang, N.M., Tsai, C.H., & Li, H. (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.*, **24**, 66–70.
- Hua, Y. & Zhou, J. (2004) Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules. *FEBS Lett.*, **572**, 69–74.
- Hubers, L., Valderrama-Carvajal, H., Laframboise, J., Timbers, J., Sanchez, G., & Côté, J. (2011) HuD interacts with survival motor neuron protein and can rescue spinal muscular atrophy-like neuronal defects. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 553–579.
- Hunter, G., Sarvestany, A.A., Roche, S.L., Symes, R.C., & Gillingwater, T.H. (2014) SMN-dependent intrinsic defects in Schwann cells in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 2235–2250.
- Jablonka, S., Beck, M., Lechner, B.D., Mayer, C., & Sendtner, M. (2007) Defective Ca²⁺ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J. Cell Biol.*, **179**, 139–149.
- Jablonka, S., Karle, K., Sandner, B., Andreassi, C., von Au, K., & Sendtner, M. (2006) Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 511–518.
- Jablonka, S., Schrank, B., Kralewski, M., Rossoll, W., & Sendtner, M. (2000) Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 341–346.
- Jablonka, S. & Sendtner, M. (2017) Developmental regulation of SMN expression: Pathophysiological implications and perspectives for therapy development in spinal muscular atrophy. *Gene Ther.*, **24**, 506–513.
- Janzen, E., Mendoza-Ferreira, N., HosseiniBarkooie, S., Schneider, S., Hupperich, K., Tschanz, T., Grysko, V., Riessland, M., Hammerschmidt, M., Rigo, F., Bennett, C.F., Kye, M.J., Torres-Benito, L., & Wirth, B. (2018) CHP1 reduction ameliorates spinal muscular atrophy pathology by restoring calcineurin activity and endocytosis. *Brain*, **141**, 2343–2361.

- Javaherian, A. & Cline, H.T. (2005) Coordinated motor neuron axon growth and neuromuscular synaptogenesis are promoted by CPG15 in vivo. *Neuron*, **45**, 505–512.
- Jin, W., Wang, Y., Chao-Pei, L., Yang, N., Jin, M., Cong, Y., Wang, M., & Rui-Ming, X. (2016) Structural basis for snRNA recognition by the double-WD40 repeat domain of Gemin5. *Genes Dev.*, **30**, 2391–2403.
- Jong, Y.J., Chang, J.G., Lin, S.P., Yang, T.Y., Wang, J.C., Chang, C.P., Lee, C.C., Li, H., Hsieh-Li, H.M., & Tsai, C.H. (2000) Analysis of the mRNA transcripts of the survival motor neuron (SMN) gene in the tissue of an SMA fetus and the peripheral blood mononuclear cells of normals, carriers and SMA patients. *J. Neurol. Sci.*, **173**, 147–153.
- Jouaville, L.S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G.A., & Rizzuto, R. (1999) Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 13807–13812.
- Jung, H., Kim, S.Y., Canbakis Cecen, F.S., Cho, Y., & Kwon, S.K. (2020) Dysfunction of Mitochondrial Ca²⁺ Regulatory Machineries in Brain Aging and Neurodegenerative Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 1–11.
- Jung, H., Yoon, B.C., & Holt, C.E. (2012) Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 308–324.
- Karamoysoyli, E., Burnand, R.C., Tomlinson, D.R., & Gardiner, N.J. (2008) Neuritin Mediates Nerve Growth Factor–Induced Axonal Regeneration and Is Deficient in Experimental Diabetic Neuropathy. *Diabetes*, **57**, 181–189.
- Kariya, S., Obis, T., Garone, C., Akay, T., Sera, F., Iwata, S., Homma, S., & Monani, U.R. (2014) Requirement of enhanced Survival Motoneuron protein imposed during neuromuscular junction maturation. *J. Clin. Invest.*, **124**, 785–800.
- Kariya, S., Park, G.H., Maeno-Hikichi, Y., Leykekhman, O., Lutz, C.M., Arkovitz, M.S., Landmesser, L.T., & Monani, U.R. (2008) Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 2552–2569.
- Kerr, D.A., Nery, J.P., Traystman, R.J., Chau, B.N., & Hardwick, J.M. (2000) Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 13312–13317.
- Khairallah, M.T., Astroski, J., Custer, S.K., Androphy, E.J., Franklin, C.L., & Lorson, C.L. (2017) SMN deficiency negatively impacts red pulp macrophages and spleen development in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **26**, 932–941.
- Kim, S.H. & Ryan, T.A. (2010) CDK5 Serves as a Major Control Point in Neurotransmitter Release. *Neuron*, **67**, 797–809.
- Koenig, E. & Giuditta, A. (1999) Protein-synthesizing machinery in the axon compartment. *Neuroscience*, **89**, 5–15.
- Koenig, E. & Martin, R. (1996) Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. *J. Neurosci.*, **16**, 1400–1411.

- Koenig, E., Martin, R., Titmus, M., & Sotelo-Silveira, J.R. (2000) Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J. Neurosci.*, **20**, 390–400.
- Kolb, S.J., Battle, D.J., & Dreyfuss, G. (2007) Molecular functions of the SMN complex. *J. Child Neurol.*, **22**, 990–994.
- Kong, L., Wang, X., Choe, D.W., Polley, M., Burnett, B.G., Bosch-Marcé, M., Griffin, J.W., Rich, M.M., & Sumner, C.J. (2009) Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J. Neurosci.*, **29**, 842–851.
- Kretschmannová, K. & Zemková, H. (2004) Characterization of neuromuscular transmission in mice with progressive motoneuronopathy. *Physiol. Res.*, **53**, 541–548.
- Kun, A., Otero, L., Sotelo-Silveira, J.R., & Sotelo, J.R. (2007) Ribosomal Distributions in Axons of Mammalian Myelinated Fibers. *J. Neurosci. Res.*, **85**, 2087–2098.
- Kye, M.J., eong, Niederst, E.D., Wertz, M.H., Gonçalves, I. do C.G., Akten, B., Dover, K.Z., Peters, M., Riessland, M., Neveu, P., Wirth, B., Kosik, K.S., Sardi, S.P., Monani, U.R., Passini, M.A., & Sahin, M. (2014) SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway. *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 6318–6331.
- Lafarga, M., Tapia, O., Romero, A.M., & Berciano, M.T. (2017) Cajal bodies in neurons. *RNA Biol.*, **14**, 712–725.
- Larivière, R.C. & Julien, J.-P. (2004) Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J. Neurobiol.*, **58**, 131–148.
- Lauria, F., Bernabò, P., Tebaldi, T., Groen, E.J.N., Perenthaler, E., Maniscalco, F., Rossi, A., Donzel, D., Clamer, M., Marchioretto, M., Omersa, N., Orri, J., Dalla Serra, M., Anderluh, G., Quattrone, A., Inga, A., Gillingwater, T.H., & Viero, G. (2020) SMN-primed ribosomes modulate the translation of transcripts related to spinal muscular atrophy. *Nat. Cell Biol.*, **22**, 1239–1251.
- Le, T.T., Covert, D.D., Monani, U.R., Morris, G.E., & Burghes, A.H.M. (2000) The survival motor neuron (SMN) protein: Effect of exon loss and mutation on protein localization. *Neurogenetics*, **3**, 7–16.
- Le, T.T., McGovern, V.L., Alwine, I.E., Wang, X., Massoni-Laporte, A., Rich, M.M., & Burghes, A.H.M. (2011) Temporal requirement for high SMN expression in SMA mice. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 3578–3591.
- Le, T.T., Pham, L.T., Butchbach, M.E.R., Zhang, H., Monani, U.R., Covert, D.D., Gavrulina, T.O., Xing, L., Bassell, G.J., & Burghes, A.H.M. (2005) SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 845–857.
- Lee, S. & Mcpherron, A.C. (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth **98**, 2–7.
- Lefebvre, S., Bürglen, L., Frézal, J., Munnich, A., & Melki, J. (1998) The role of the SMN gene in proximal spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 1531–1536.

- Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., Le Paslier, D., Frézal, J., Cohen, D., Weissenbach, J., Munnich, A., & Melki, J. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, **80**, 155–165.
- Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G., & Melki, J. (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.*, **16**, 265–269.
- Lepelletier, L., Langlois, S., Kent, C.B., Welshhans, K., Morin, S., Bassell, G.J., Yam, P.T., & Charron, F. (2017) Sonic hedgehog guides axons via zipcode binding protein 1-mediated local translation. *J. Neurosci.*, **37**, 1685–1695.
- Li, D.K., Tisdale, S., Lotti, F., & Pellizzoni, L. (2014) SMN control of RNP assembly: from post-transcriptional gene regulation to motor neuron disease. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **32**, 22–29.
- Lin, A.C. & Holt, C.E. (2008) Function and regulation of local axonal translation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **18**, 60–68.
- Ling, K.K.Y., Gibbs, R.M., Feng, Z., & Ko, C.-P. (2012) Severe neuromuscular denervation of clinically relevant muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 185–195.
- Liu, H., Shafey, D., Mooresa, J.N., & Kothary, R. (2010) Neurodevelopmental consequences of Smn depletion in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Neurosci. Res.*, **88**, 111–122.
- Liu, Q. & Dreyfuss, G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.*, **15**, 3555–3565.
- Liu, Q., Fischer, U., Wang, F., & Dreyfuss, G. (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell*, **90**, 1013–1021.
- Locatelli, D., Terao, M., Fratelli, M., Zanetti, A., Kurosaki, M., Lupi, M., Barzago, M.M., Uggetti, A., Capra, S., D’Errico, P., Battaglia, G.S., & Garattini, E. (2012) Human Axonal Survival of Motor Neuron (a-SMN) Protein Stimulates Axon Growth, Cell Motility, C-C Motif Ligand 2 (CCL2), and Insulin-like Growth Factor-1 (IGF1) Production. *J. Biol. Chem.*, **287**, 25782–25794.
- Long, K.K., O’Shea, K.M., Khairallah, R.J., Howell, K., Paushkin, S., Chen, K.S., Cote, S.M., Webster, M.T., Stains, J.P., Treece, E., Buckler, A., & Donovan, A. (2019) Specific inhibition of myostatin activation is beneficial in mouse models of SMA therapy. *Hum. Mol. Genet.*, **28**, 1076–1089.
- Lopez-Manzaneda, M., Franco-Espin, J., Tejero, R., Cano, R., & Tabares, L. (2021) Calcium is Reduced in Presynaptic Mitochondria of Motor Nerve Terminals during Neurotransmission in SMA Mice. *Hum. Mol. Genet.* doi: 10.1093/hmg/ddab065
- Lorson, C.L. & Androphy, E.J. (1998) The domain encoded by exon 2 of the survival motor neuron protein mediates nucleic acid binding. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 1269–1275.
- Lorson, C.L. & Androphy, E.J. (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 259–266.

- Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J., & Wirth, B. (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 6307–6311.
- Lorson, C.L., Strasswimmer, J., Yao, J.-M., Baleja, J.D., Hahnen, E., Wirth, B., Le, T.T., Burghes, A.H.M., & Androphy, E.J. (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat. Genet.*, **19**, 63–66.
- Lowes, L.P., Alfano, L.N., Arnold, W.D., Shell, R., Prior, T.W., McColly, M., Lehman, K.J., Church, K., Sproule, D.M., Nagendran, S., Menier, M., Feltner, D.E., Wells, C., Kissel, J.T., Al-Zaidy, S., & Mendell, J. (2019) Impact of Age and Motor Function in a Phase 1/2A Study of Infants With SMA Type 1 Receiving Single-Dose Gene Replacement Therapy. *Pediatr. Neurol.*, **98**, 39–45.
- Lutz, C.M., Kariya, S., Patrini, S., Osborne, M.A., Liu, D., Henderson, C.E., Li, D.K., Pellizzoni, L., Rojas, J., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Winberg, M.L., & Monani, U.R. (2011) Postsymptomatic restoration of SMN rescues the disease phenotype in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.*, **121**, 3029–3041.
- MacAskill, A.F., Atkin, T.A., & Kittler, J.T. (2010) Mitochondrial tracking and the provision of energy and calcium buffering at excitatory synapses. *Eur. J. Neurosci.*, **32**, 231–240.
- Mahmoudi, S., Henriksson, S., Weibrecht, I., Smith, S., Söderberg, O., Strömblad, S., Wiman, K.G., & Farnebo, M. (2010) Wrap53 Is Essential for Cajal Body Formation and for Targeting the Survival of Motor Neuron Complex To Cajal Bodies. *PLoS Biol.*, **8**, 1–16.
- Markowitz, J.A., Singh, P., & Darras, B.T. (2012) Spinal muscular atrophy: a clinical and research update. *Pediatr. Neurol.*, **46**, 1–12.
- Martin, R., Gupta, K., Ninan, N.S., Perry, K., & Van Duyne, G.D. (2012) The survival motor neuron protein forms soluble glycine zipper oligomers. *Structure*, **20**, 1929–1939.
- Martínez-Hernández, R., Soler-Botija, C., Also-Rallo, E., Alias, L., Caselles, L., Gich, I., Bernal, S., & Tizzano, E.F. (2009) The developmental pattern of myotubes in spinal muscular atrophy indicates prenatal delay of muscle maturation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **68**, 474–481.
- Martinez, T.L., Kong, L., Wang, X., Osborne, M.A., Crowder, M.E., Van Meerbeke, J.P., Xu, X., Davis, C., Wooley, J., Goldhamer, D.J., Lutz, C.M., Rich, M.M., & Sumner, C.J. (2012) Survival motor neuron protein in motor neurons determines synaptic integrity in spinal muscular atrophy. *J. Neurosci.*, **32**, 8703–8715.
- Matera, A.G., Terns, R.M., & Terns, M.P. (2007) Non-coding RNAs: Lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 209–220.
- Matera, A.G. & Wang, Z. (2014) A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 108–121.
- Maurer-stroh, S., Dickens, N.J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., & Ponting, C.P. (2003) The Tudor domain ‘Royal Family’: *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 69–74.
- Maxwell, G.K., Szunyogova, E., Shorrock, H.K., Gillingwater, T.H., & Parson, S.H.

- (2018) Developmental and degenerative cardiac defects in the Taiwanese mouse model of severe spinal muscular atrophy. *J. Anat.*, **232**, 965–978.
- McCarty, D.M., Monahan, P.E., & Samulski, R.J. (2001) Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.*, **8**, 1248–1254.
- McCormack, J.G., Halestrap, A.P., & Denton, R.M. (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.*, **70**, 391–425.
- McGivern, J. V., Patitucci, T.N., Nord, J.A., Barabas, M.-E.A., Stucky, C.L., & Ebert, A.D. (2013) Spinal muscular atrophy astrocytes exhibit abnormal calcium regulation and reduced growth factor production. *Glia*, **61**, 1418–1428.
- McGovern, V.L., Iyer, C.C., Arnold, W.D., Gombash, S.E., Zaworski, P.G., Blatnik, A.J., Foust, K.D., & Burghes, A.H.M. (2015) SMN expression is required in motor neurons to rescue electrophysiological deficits in the SMN Δ 7 mouse model of SMA. *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 5524–5541.
- Meister, G., Eggert, C., Bühler, D., Brahms, H., Kambach, C., & Fischer, U. (2001) Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr. Biol.*, **11**, 1990–1994.
- Meister, G., Eggert, C., & Fischer, U. (2002) SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol.*, **12**, 472–478.
- Mentis, G.Z., Blivis, D., Liu, W., Drobac, E., Crowder, M.E., Kong, L., Alvarez, F.J., Sumner, C.J., & O'Donovan, M.J. (2011) Early Functional Impairment of Sensory-Motor Connectivity in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *Neuron*, **69**, 453–467.
- Mercuri, E., Darras, B.T., Chiriboga, C.A., Day, J.W., Campbell, C., Connolly, A.M., Iannaccone, S.T., Kirschner, J., Kuntz, N.L., Saito, K., Shieh, P.B., Tulinius, M., Mazzone, E.S., Montes, J., Bishop, K.M., Yang, Q., Foster, R., Gheuens, S., Bennett, C.F., Farwell, W., Schneider, E., De Vivo, D.C., & Finkel, R.S. (2018) Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.*, **378**, 625–635.
- Merlini, L., Solari, A., Vita, G., Bertini, E., Minetti, C., Mongini, T., Mazzoni, E., Angelini, C., & Morandi, L. (2003) Role of gabapentin in spinal muscular atrophy: Results of a multicenter, randomized Italian study. *J. Child Neurol.*, **18**, 537–541.
- Miller, N., Shi, H., Zelikovich, A.S., & Ma, Y.C. (2016) Motor neuron mitochondrial dysfunction in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 3395–3406.
- Mobarak, C.D., Anderson, K.D., Morin, M., Beckel-Mitchener, A., Rogers, S.L., Furneaux, H., King, P., & Perrone-Bizzozero, N.I. (2000) The RNA-binding protein HuD is required for GAP-43 mRNA stability, GAP-43 gene expression, and PKC-dependent neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 3191–3203.
- Monani, U.R., Covert, D.D., & Burghes, A.H.M. (2000) Animal models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2451–2457.
- Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H.M., & McPherson, J.D. (1999) A single nucleotide difference that alters splicing

- patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1177–1183.
- Monani, U.R., Sendtner, M., Coovert, D.D., Parsons, D.W., Andreassi, C., Le, T.T., Jablonka, S., Schrank, B., Rossoll, W., Prior, T.W., Morris, G.E., & Burghes, A.H.M. (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*^{-/-} mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 333–339.
- Moradi, M., Sivadasan, R., Saal, L., Lüningschrör, P., Dombert, B., Rathod, R.J., Dieterich, D.C., Blum, R., & Send (2017) Differential roles of α -, β -, and γ -actin in axon growth. *J. Cell Biol.*, **216**, 793–814.
- Murdocca, M., Malgieri, A., Luchetti, A., Saieva, L., Dobrowolny, G., de Leonibus, E., Filareto, A., Quitadamo, M.C., Novelli, G., Musarò, A., & Sangiuolo, F. (2012) IPLEX administration improves motor neuron survival and ameliorates motor functions in a severe mouse model of spinal muscular atrophy. *Mol. Med.*, **18**, 1076–1085.
- Murray, L.M., Comley, L.H., Thomson, D., Parkinson, N., Talbot, K., & Gillingwater, T.H. (2008) Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 949–962.
- Mushegian, A.R., Bassett, D.E., Boguski, M.S., Bork, P., & Koonin, E. V. (1997) Positionally cloned human disease genes: Patterns of evolutionary conservation and functional motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 5831–5836.
- Narayanan, U., Achsel, T., Lührmann, R., & Matera, A.G. (2004) Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Mol. Cell*, **16**, 223–234.
- Narayanan, U., Ospina, J.K., Frey, M.R., Hebert, M.D., & Matera, A.G. (2002) SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1785–1795.
- Nguyen, K.T. & Garcı, L.E. (2011) The depolarization that accompanies Ca uptake is greater in mutant SOD1 than in WT mouse motor terminals **106**, 2007–2011.
- Nicholls, D.G. & Chalmers, S. (2004) The integration of mitochondrial calcium transport and storage. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **36**, 277–281.
- Nielsen, P.R., Nietlispach, D., Mott, H.R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A.G., Murzina, N. V., & Laue, E.D. (2002) Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature*, **416**, 103–107.
- Nölle, A., Zeug, A., Van bergeijk, J., Tönges, L., Gerhard, R., Brinkmann, H., Al rayes, S., Hensel, N., Schill, Y., Apkhazava, D., Jablonka, S., O’mer, J., Kumar srivastav, R., Baasner, A., Lingor, P., Wirth, B., Ponimaskin, E., Niedenthal, R., Grothe, C., & Claus, P. (2011) The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the Rho-kinase pathway via profilin. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 4865–4878.
- Ojala, K.S., Reedich, E.J., DiDonato, C.J., & Meriney, S.D. (2021) In Search of a Cure: The Development of Therapeutics to Alter the Progression of Spinal Muscular Atrophy. *Brain Sci.*, **11**, 194.

- Otter, S., Grimmler, M., Neuenkirchen, N., Chari, A., Sickmann, A., & Fischer, U. (2007) A comprehensive interaction map of the human survival of motor neuron (SMN) complex. *J. Biol. Chem.*, **282**, 5825–5833.
- Pellizzoni, L. (2007) Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep.*, **8**, 340–345.
- Pellizzoni, L., Baccon, J., Charroux, B., & Dreyfuss, G. (2001) The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr. Biol.*, **11**, 1079–1088.
- Pellizzoni, L., Baccon, J., Rappsilber, J., Mann, M., & Dreyfuss, G. (2002) Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component. *J. Biol. Chem.*, **277**, 7540–7545.
- Pellizzoni, L., Charroux, B., & Dreyfuss, G. (1999) SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 11167–11172.
- Pellizzoni, L., Charroux, B., Rappsilber, J., Mann, M., & Dreyfuss, G. (2001) A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J. Cell Biol.*, **152**, 75–85.
- Pellizzoni, L., Yong, J., & Dreyfuss, G. (2002) Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science*, **298**, 1775–1779.
- Periyakaruppiyah, A., de la Fuente, S., Arumugam, S., Bahí, N., Garcera, A., & Soler, R.M. (2016) Autophagy modulators regulate survival motor neuron protein stability in motoneurons. *Exp. Neurol.*, **283**, 287–297.
- Peter, C.J., Evans, M., Thayanithy, V., Taniguchi-Ishigaki, N., Bach, I., Kolpak, A., Bassell, G.J., Rossoll, W., Lorson, C.L., Bao, Z.Z., & Androphy, E.J. (2011) The COPI vesicle complex binds and moves with survival motor neuron within axons. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 1701–1711.
- Piazzon, N., Rage, F., Schlotter, F., Moine, H., Branlant, C., & Massenet, S. (2008) In vitro and in Cellulo evidences for association of the survival of motor neuron complex with the fragile X mental retardation protein. *J. Biol. Chem.*, **283**, 5598–5610.
- Picard, N., Leslie, J.H., Trowbridge, S.K., Subramanian, J., Nedivi, E., & Fagiolini, M. (2014) Aberrant development and plasticity of excitatory visual cortical networks in the absence of cpg15. *J. Neurosci.*, **34**, 3517–3522.
- Pillai, R.S., Grimmler, M., Meister, G., Will, C.L., Lührmann, R., Fischer, U., & Schümperli, D. (2003) Unique Sm core structure of U7 snRNPs: Assembly by a specialized SMN complex and the role of a new component, Lsm11, in histone RNA processing. *Genes Dev.*, **17**, 2321–2333.
- Piñeiro, D., Fernandez-Chamorro, J., Francisco-Velilla, R., & Martinez-Salas, E. (2015) Gemin5: A multitasking RNA-binding protein involved in translation control. *Biomolecules*, **5**, 528–544.
- Piras, A., Schiaffino, L., Boido, M., Valsecchi, V., Guglielmotto, M., De Amicis, E., Puyal, J., Garcera, A., Tamagno, E., Soler, R.M., & Vercelli, A. (2017) Inhibition of autophagy delays motoneuron degeneration and extends lifespan in a mouse model

- of spinal muscular atrophy. *Cell Death Dis.*, **8**.
- Plessel, G., Fischer, U., & Lührmann, R. (1994) m3G cap hypermethylation of U1 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) in vitro: evidence that the U1 small nuclear RNA-(guanosine-N2)-methyltransferase is a non-snRNP cytoplasmic protein that requires a binding site on the Sm core domain. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4160–4172.
- Ponting, C.P. (1997) Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 51–52.
- Poole, A.R. & Hebert, M.D. (2016) SMN and coilin negatively regulate dyskerin association with telomerase RNA. *Biol. Open*, **5**, 726–735.
- Porensky, P.N. & Burghes, A.H.M. (2013) Antisense oligonucleotides for the treatment of spinal muscular atrophy. *Hum. Gene Ther.*, **24**, 489–498.
- Powis, R.A. & Gillingwater, T.H. (2016) Selective loss of alpha motor neurons with sparing of gamma motor neurons and spinal cord cholinergic neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Anat.*, **228**, 443–451.
- Price, P.L., Morderer, D., & Rossoll, W. (2018) RNP assembly defects in spinal muscular atrophy. *Adv. Neurobiol.*, **20**, 143–171.
- Protter, D.S.W. & Parker, R. (2016) Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol.*, **26**, 668–679.
- Rafałowska, J., Sulejczak, D., Chrapusta, S.J., Gadamski, R., & Dziewulska, D. (2014) Diverse Expression of Selected SMN Complex Proteins in Humans with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis and in a Transgenic Rat Model of Familial Form of the Disease. *PLoS One*, **9**, e104614.
- Rafałowska, J., Sulejczak, D., Gadamski, R., & Dziewulska, D. (2012) Immunoexpression of gemins 2 and 4 in the rat spinal cord. Is the SMN complex a new target in investigations of sporadic amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis? *Folia Neuropathol.*, **50**, 390–396.
- Rage, F., Boulisfane, N., Rihan, K., Neel, H., Gostan, T., Bertrand, E., Bordonné, R., & Soret, J. (2013) Genome-wide identification of mRNAs associated with the protein SMN whose depletion decreases their axonal localization. *RNA*, **19**, 1755–1766.
- Raimer, A.C., Gray, K.M., & Matera, A.G. (2017) SMN - A chaperone for nuclear RNP social occasions? *RNA Biol.*, **14**, 701–711.
- Raker, V.A., Hartmuth, K., Kastner, B., & Lührmann, R. (1999) Spliceosomal U snRNP core assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6554–6565.
- Rangaraju, V., Calloway, N., & Ryan, T.A. (2014) Activity-Driven Local ATP Synthesis Is Required for Synaptic Function. *Cell*, **156**, 825–835.
- Rathod, R., Havlicek, S., Frank, N., Blum, R., & Sendtner, M. (2012) Laminin induced local axonal translation of β -actin mRNA is impaired in SMN-deficient motoneurons. *Histochem. Cell Biol.*, **138**, 737–748.
- Ratni, H., Ebeling, M., Baird, J., Bendels, S., Bylund, J., Chen, K.S., Denk, N., Feng, Z., Green, L., Guerard, M., Jablonski, P., Jacobsen, B., Khwaja, O., Kletzl, H., Ko, C.P., Kustermann, S., Marquet, A., Metzger, F., Mueller, B., Naryshkin, N.A., Paushkin,

- S. V., Pinard, E., Poirier, A., Reutlinger, M., Weetall, M., Zeller, A., Zhao, X., & Mueller, L. (2018) Discovery of Risdiplam, a Selective Survival of Motor Neuron-2 (SMN2) Gene Splicing Modifier for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *J. Med. Chem.*, **61**, 6501–6517.
- Riessland, M., Kaczmarek, A., Schneider, S., Swoboda, K.J., Löhr, H., Bradler, C., Grysko, V., Dimitriadi, M., Hosseinibarkooie, S., Torres-Benito, L., Peters, M., Upadhyay, A., Biglari, N., Kröber, S., Hölker, I., Garbes, L., Gilissen, C., Hoischen, A., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Walter, M., Rigo, F., Bennett, C.F., Kye, M.J., Hart, A.C., Hammerschmidt, M., Kloppenburg, P., & Wirth, B. (2017) Neurocalcin Delta Suppression Protects against Spinal Muscular Atrophy in Humans and across Species by Restoring Impaired Endocytosis. *Am. J. Hum. Genet.*, **100**, 297–315.
- Rindt, H., Feng, Z., Mazzasette, C., Glascock, J.J., Valdivia, D., Pyles, N., Crawford, T.O., Swoboda, K.J., Patitucci, T.N., Ebert, A.D., Sumner, C.J., Ko, C.P., & Lorson, C.L. (2015) Astrocytes influence the severity of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 4094–4102.
- Rochette, C.F., Gilbert, N., & Simard, L.R. (2001) SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Hum. Genet.*, **108**, 255–266.
- Rodriguez-Muela, N., Parkhitko, A., Grass, T., Gibbs, R.M., Norabuena, E.M., Perrimon, N., Singh, R., & Rubin, L.L. (2018) Blocking p62-dependent SMN degradation ameliorates spinal muscular atrophy disease phenotypes. *J. Clin. Invest.*, **128**, 3008–3023.
- Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kröning, A.K., Karle, K., Monani, U.R., & Sendtner, M. (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of β -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J. Cell Biol.*, **163**, 801–812.
- Rossoll, W., Kröning, A.-K., Ohndorf, U.-M., Steegborn, C., Jablonka, S., & Sendtner, M. (2002) Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 93–105.
- Rudnik-Schöneborn, S., Heller, R., Berg, C., Betzler, C., Grimm, T., Eggermann, T., Eggermann, K., Wirth, R., Wirth, B., & Zerres, K. (2008) Congenital heart disease is a feature of severe infantile spinal muscular atrophy. *J. Med. Genet.*, **45**, 635–638.
- Rueda, C.B., Llorente-Folch, I., Traba, J., Amigo, I., Gonzalez-Sanchez, P., Contreras, L., Juaristi, I., Martinez-Valero, P., Pardo, B., del Arco, A., & Satrustegui, J. (2016) Glutamate excitotoxicity and Ca²⁺-regulation of respiration: Role of the Ca²⁺ activated mitochondrial transporters (CaMCs). *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1158–1166.
- Ruggiu, M., McGovern, V.L., Lotti, F., Saieva, L., Li, D.K., Kariya, S., Monani, U.R., Burghes, A.H.M., & Pellizzoni, L. (2012) A Role for SMN Exon 7 Splicing in the Selective Vulnerability of Motor Neurons in Spinal Muscular Atrophy. *Mol. Cell Biol.*, **32**, 126–138.
- Ruiz, R., Casañas, J.J., Torres-Benito, L., Cano, R., & Tabares, L. (2010) Altered intracellular Ca²⁺ homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy

- mice. *J. Neurosci.*, **30**, 849–857.
- Saal, L., Briese, M., Kneitz, S., Glinka, M., & Sendtner, M. (2014) Spinal muscular atrophy point to widespread defects in axonal growth and presynaptic differentiation Subcellular transcriptome alterations in a cell culture model of spinal muscular atrophy point to widespread defects in axonal growth and presynaptic diff 1789–1802.
- Sanchez, G., Dury, A.Y., Murray, L.M., Biondi, O., Tadesse, H., El fatimy, R., Kothary, R., Charbonnier, F., Khandjian, E.W., & Côté, J. (2013) A novel function for the survival motoneuron protein as a translational regulator. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 668–684.
- Sankaranarayanan, S., De Angelis, D., Rothman, J.E., & Ryan, T.A. (2000) The Use of pFluorins for Optical Measurements of Presynaptic Activity. *Biophys. J.*, **79**, 2199–2208.
- Sanna, M.D., Ghelardini, C., & Galeotti, N. (2017) HuD-mediated distinct BDNF regulatory pathways promote regeneration after nerve injury. *Brain Res.*, **1659**, 55–63.
- Sanna, M.D., Quattrone, A., Mello, T., Ghelardini, C., & Galeotti, N. (2014) The RNA-binding protein HuD promotes spinal GAP43 overexpression in antiretroviral-induced neuropathy. *Exp. Neurol.*, **261**, 343–353.
- Schrank, B., Götz, R., Gunnensen, J.M., Ure, J.M., Toyka, K. V, Smith, A.G., & Sendtner, M. (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 9920–9925.
- Schümperli, D. & Pillai, R.S. (2004) The special Sm core structure of the U7 snRNP: Far-reaching significance of a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 2560–2570.
- Selenko, P., Sprangers, R., Stier, G., Bühler, D., Fischer, U., & Sattler, M. (2001) SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 27–31.
- Seo, J., Singh, N.N., Ottesen, E.W., Lee, B.M., & Singh, R.N. (2016) A novel human-specific splice isoform alters the critical C-terminus of Survival Motor Neuron protein. *Sci. Rep.*, **6**, 1–14.
- Setola, V., Terao, M., Locatelli, D., Bassanini, S., Garattiini, E., & Battaglia, G.S. (2007) Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron is specifically involved in axonogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 1959–1964.
- Shigeoka, T., Jung, H., Jung, J., Turner-Bridger, B., Ohk, J., Lin, J.Q., Amieux, P.S., & Holt, C.E. (2016) Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits. *Cell*, **166**, 181–192.
- Simon, C.M., Blanco-Redondo, B., Buettner, J.M., Pagiazitis, J.G., Fletcher, E. V., Sime Longang, J.K., & Mentis, G.Z. (2021) Chronic Pharmacological Increase of Neuronal Activity Improves Sensory-Motor Dysfunction in Spinal Muscular Atrophy Mice. *J. Neurosci.*, **41**, 376–389.

- Simon, C.M., Dai, Y., Van Alstyne, M., Koutsidoumpa, C., Pagiazitis, J.G., Chalif, J.I., Wang, X., Rabinowitz, J.E., Henderson, C.E., Pellizzoni, L., & Mentis, G.Z. (2017) Converging Mechanisms of p53 Activation Drive Motor Neuron Degeneration in Spinal Muscular Atrophy. *Cell Rep.*, **21**, 3767–3780.
- Singh, N.N., Lee, B.M., DiDonato, C.J., & Singh, R.N. (2015) Mechanistic principles of antisense targets for the treatment of spinal muscular atrophy. *Future Med. Chem.*, **7**, 1793–1808.
- Singh, R.N., Howell, M.D., Ottesen, E.W., & Singh, N.N. (2017) Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 299–315.
- Sivaramakrishnan, M., McCarthy, K.D., Campagne, S., Huber, S., Meier, S., Augustin, A., Heckel, T., Meistermann, H., Hug, M.N., Birrer, P., Moursy, A., Khawaja, S., Schmucki, R., Berntenis, N., Giroud, N., Golling, S., Tzouros, M., Banfai, B., Duran-Pacheco, G., Lamerz, J., Hsiu Liu, Y., Luebbers, T., Ratni, H., Ebeling, M., Cléry, A., Paushkin, S., Krainer, A.R., Allain, F.H.T., & Metzger, F. (2017) Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers. *Nat. Commun.*, **8**, 1476.
- Sotelo-Silveira, J., Crispino, M., Puppò, A., Sotelo, J.R., & Koenig, E. (2008) Myelinated axons contain β -actin mRNA and ZBP-1 in periaxoplasmic ribosomal plaques and depend on cyclic AMP and F-actin integrity for in vitro translation. *J. Neurochem.*, **104**, 545–557.
- Spence, E.F. & Soderling, S.H. (2015) Actin out: Regulation of the synaptic cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*, **290**, 28613–28622.
- Sun, Y., Grimmer, M., Schwarzer, V., Schoenen, F., Fischer, U., & Wirth, B. (2005) Molecular and functional analysis of intragenic SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy. *Hum. Mutat.*, **25**, 64–71.
- Swanger, S.A. & Bassell, G.J. (2011) Making and breaking synapses through local mRNA regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 414–421.
- Tabares, L., Ruiz, R., Linares-Clemente, P., Gaffield, M.A., Alvarez De Toledo, G., Fernandez-Chacón, R., & Betz, W.J. (2007) Monitoring synaptic function at the neuromuscular junction of a mouse expressing synaptopHluorin. *J. Neurosci.*, **27**, 5422–5430.
- Takaku, M., Tsujita, T., Horikoshi, N., Takizawa, Y., Qing, Y., Hirota, K., Ikura, M., Ikura, T., Takeda, S., & Kurumizaka, H. (2011) Purification of the human SMN-GEMIN2 complex and assessment of its stimulation of RAD51-mediated DNA recombination reactions. *Biochemistry*, **50**, 6797–6805.
- Talbot, K., Miguel-Aliaga, I., Mohaghegh, P., Ponting, C.P., & Davies, K.E. (1998) Characterization of a gene encoding Survival Motor Neuron (SMN)-related protein, a constituent of the spliceosome complex. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 2149–2156.
- Talbot, K., Ponting, C.P., Theodosiou, A.M., Rodrigues, N.R., Surtees, R., Mountford, R., & Davies, K.E. (1997) Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 497–500.
- Tapia, O., Bengoechea, R., Palanca, A., Arteaga, R., Val-Bernal, J.F., Tizzano, E.F.,

- Berciano, M.T., & Lafarga, M. (2012) Reorganization of Cajal bodies and nucleolar targeting of coilin in motor neurons of type I spinal muscular atrophy. *Histochem. Cell Biol.*, **137**, 657–667.
- Tarr, T.B., Lacomis, D., Reddel, S.W., Liang, M., Valdomir, G., Frasso, M., Wipf, P., & Meriney, S.D. (2014) Complete reversal of Lambert-Eaton myasthenic syndrome synaptic impairment by the combined use of a K⁺ channel blocker and a Ca²⁺ channel agonist. *J. Physiol.*, **592**, 3687–3696.
- Tarr, T.B., Malick, W., Liang, M., Valdomir, G., Frasso, M., Lacomis, D., Reddel, S.W., Garcia-Ocano, A., Wipf, P., & Meriney, S.D. (2013) Evaluation of a novel calcium channel agonist for therapeutic potential in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J. Neurosci.*, **33**, 10559–10567.
- Tarr, T.B., Valdomir, G., Liang, M., Wipf, P., & Meriney, S.D. (2012) New calcium channel agonists as potential therapeutics in Lambert-Eaton myasthenic syndrome and other neuromuscular diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1275**, 85–91.
- Tasdemir-Yilmaz, O.E. & Segal, R.A. (2016) There and back again: Coordinated transcription, translation and transport in axonal survival and regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **39**, 62–68.
- Tejero, R. (2016) Identificación de componentes moleculares sinápticos que contribuyen a la vulnerabilidad de los terminales nerviosos motores en un modelo murino de atrofia muscular espinal. Universidad de Sevilla.
- Tejero, R., Balk, S., Appenzeller, S., Tabares, L., Jablonka, S., Tejero, R., Balk, S., Franco-Espin, J., Ojeda, J., Hennlein, L., Drexler, H., Dombert, B., Clausen, J., Torresbenito, L., Saal-bauernschubert, L., Blum, R., Briese, M., Appenzeller, S., Tabares, L., & Jablonka, S. (2020) R-Roscovitine Improves Motoneuron Function in Mouse Models for Spinal Muscular Atrophy R-Roscovitine Improves Motoneuron Function in Mouse Models for Spinal Muscular Atrophy. *iScience*, **23**, 100826.
- Tejero, R., Lopez-Manzaneda, M., Arumugam, S., & Tabares, L. (2016) Synaptotagmin-2, and -1, linked to neurotransmission impairment and vulnerability in Spinal Muscular Atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 4703–4716.
- Tejero, R., Lopez-Manzaneda, M., Franco-Espín, J., & Tabares, L. (2018) Maturation and heterogeneity of vertebrate motor synapses. *Curr. Opin. Physiol.*, **4**, 1–6.
- Tharun, S. (2009) Roles of Eukaryotic Lsm Proteins in the Regulation of mRNA Function. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **272**, 149–189
- Tisdale, S., Lotti, F., Saieva, L., Van Meerbeke, J.P., Crawford, T.O., Sumner, C.J., Mentis, G.Z., & Pellizzoni, L. (2013) SMN is essential for the biogenesis of U7 small nuclear ribonucleoprotein and 3'-end formation of histone mRNAs. *Cell Rep.*, **5**, 1187–1195.
- Todd, A.G., Morse, R., Shaw, D.J., McGinley, S., Stebbings, H., & Young, P.J. (2010) SMN, Gemin2 and Gemin3 associate with beta-actin mRNA in the cytoplasm of neuronal cells in vitro. *J. Mol. Biol.*, **401**, 681–689.
- Todd, A.G., Morse, R., Shaw, D.J., Stebbings, H., & Young, P.J. (2010) Analysis of SMN-neurite granules: Core Cajal body components are absent from SMN-cytoplasmic complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **397**, 479–485.

- Todd, A.G., Shaw, D.J., Morse, R., Stebbings, H., & Young, P.J. (2010) SMN and the Gemin proteins form sub-complexes that localise to both stationary and dynamic neurite granules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **394**, 211–216.
- Tomizawa, K., Ohta, J., Matsushita, M., Moriwaki, A., Li, S.T., Takei, K., & Matsui, H. (2002) Cdk5/p35 Regulates Neurotransmitter Release through Phosphorylation and Downregulation of P/Q-Type Voltage-Dependent Calcium Channel Activity. *J. Neurosci.*, **22**, 2590–2597.
- Torres-Benito, L. (2012) Función de la proteína de supervivencia de la motoneurona (SMN) en la maduración funcional y organización sináptica en un modelo murino de atrofia muscular espinal. Universidad de Sevilla.
- Torres-Benito, L., Neher, M.F., Cano, R., Ruiz, R., & Tabares, L. (2011) SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals. *PLoS One*, **6**, e26164.
- Torres-Benito, L., Ruiz, R., & Tabares, L. (2012) Synaptic defects in spinal muscular atrophy animal models. *Dev. Neurobiol.*, **72**, 126–133.
- Tseng, Y.T., Chen, C.S., Jong, Y.J., Chang, F.R., & Lo, Y.C. (2016) Loganin possesses neuroprotective properties, restores SMN protein and activates protein synthesis positive regulator Akt/mTOR in experimental models of spinal muscular atrophy. *Pharmacol. Res.*, **111**, 58–75.
- Van Alstyne, M., Simon, C.M., Sardi, S.P., Shihabuddin, L.S., Mentis, G.Z., & Pellizzoni, L. (2018) Dysregulation of Mdm2 and Mdm4 alternative splicing underlies motor neuron death in spinal muscular atrophy. *Genes Dev.*, **32**, 1045–1059.
- Van Alstyne, M., Tattoli, I., Delestrée, N., Recinos, Y., Workman, E., Shihabuddin, L.S., Zhang, C., Mentis, G.Z., & Pellizzoni, L. (2021) Gain of toxic function by long-term AAV9-mediated SMN overexpression in the sensorimotor circuit. *Nat. Neurosci.*, doi: 10.1038/s41593-021-00827-3.
- Vanevski, F. & Xu, B. (2015) HuD Interacts with Bdnf mRNA and Is Essential for Activity-Induced BDNF Synthesis in Dendrites. *PLoS One*, **10**, e0117264.
- Villarroyel-Campos, D. & Gonzalez-Billault, C. (2014) The MAP1B case: An old MAP that is new again. *Dev. Neurobiol.*, **74**, 953–971.
- Wahl, M.C. & Fischer, U. (2016) The right pick: Structural basis of snRNA selection by Gemin5. *Genes Dev.*, **30**, 2341–2344.
- Wahl, M.C., Will, C.L., & Lührmann, R. (2009) The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell*, **136**, 701–718.
- Walker, M.P., Rajendra, T.K., Saieva, L., Fuentes, J.L., Pellizzoni, L., & Matera, A.G. (2008) SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 3399–3410.
- Wang, C.-Y., Lin, H.-C., Song, Y.-P., Hsu, Y.-T., Lin, S.-Y., Hsu, P.-C., Lin, C.-H., Hung, C.-C., Hsu, M.-C., Kuo, Y.-M., Lee, Y.-J., Hsu, C.Y., & Lee, Y.-H. (2015) Protein Kinase C-Dependent Growth-Associated Protein 43 Phosphorylation Regulates Gephyrin Aggregation at Developing GABAergic Synapses. *Mol. Cell Biol.*, **35**, 1712–1726.

- Wen, H.L., Lin, Y.T., Ting, C.H., Lin-Chao, S., Li, H., & Hsieh-Li, H.M. (2010) Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 1766–1778.
- Wertz, M.H., Winden, K., Neveu, P., Ng, S., Ercan, E., & Sahin, M. (2016) Cell-type-specific miR-431 dysregulation in a motor neuron model of spinal muscular atrophy **25**, 2168–2181.
- Wirth, B. (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum. Mutat.*, **15**, 228–237.
- Wishart, T.M., Mutsaers, C.A., Riessland, M., Reimer, M.M., Hunter, G., Hannam, M.L., Eaton, S.L., Fuller, H.R., Roche, S.L., Somers, E., Morse, R., Young, P.J., Lamont, D.J., Hammerschmidt, M., Joshi, A., Hohenstein, P., Morris, G.E., Parson, S.H., Skehel, P.A., Becker, T., Robinson, I.M., Becker, C.G., Wirth, B., & Gillingwater, T.H. (2014) Dysregulation of ubiquitin homeostasis and β -catenin signaling promote spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.*, **124**, 1821–1834.
- Wu, M., White, H. V, Boehm, B., Meriney, C.J., Kerrigan, K., Frasso, M., Liang, M., Gotway, E.M., Wilcox, M., Johnson, J.W., Wipf, P., & Meriney, S.D. (2019) New Cav2 calcium channel gating modifiers with agonist activity and therapeutic potential to treat neuromuscular disease. *Neuropharmacology*, **131**, 176–189.
- Wurth, L., Gribling-Burrer, A.S., Verheggen, C., Leichter, M., Takeuchi, A., Baudrey, S., Martin, F., Krol, A., Bertrand, E., & Allmang, C. (2014) Hypermethylated-capped selenoprotein mRNAs in mammals. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8663–8677.
- Yan, Z., Chi, P., Bibb, J.A., Ryan, T.A., & Greengard, P. (2002) Roscovitine: A novel regulator of P/Q-type calcium channels and transmitter release in central neurons. *J. Physiol.*, **540**, 761–770.
- Yan, Z., Kim, E., Datta, D., Lewis, D.A., & Soderling, S.H. (2016) Synaptic actin dysregulation, a convergent mechanism of mental disorders? *J. Neurosci.*, **36**, 11411–11417.
- Yeo, C.J.J. & Darras, B.T. (2020) Overturning the Paradigm of Spinal Muscular Atrophy as Just a Motor Neuron Disease. *Pediatr. Neurol.*, **109**, 12–19.
- Yong, J., Kasim, M., Bachorik, J.L., Wan, L., & Dreyfuss, G. (2010) Gemin5 Delivers snRNA Precursors to the SMN Complex for snRNP Biogenesis. *Mol. Cell*, **38**, 551–562.
- Yoo, S., Kim, H.H., Kim, P., Donnelly, C.J., Kalinski, A.L., Vuppalachchi, D., Park, M., Lee, S.J., Merianda, T.T., Perrone-Bizzozero, N.I., & Twiss, J.L. (2013) A HuD-ZBP1 ribonucleoprotein complex localizes GAP-43 mRNA into axons through its 3' untranslated region AU-rich regulatory element. *J. Neurochem.*, **126**, 792–804.
- Yoshimoto, S., Harahap, N.I.F., Hamamura, Y., Ar Rochmah, M., Shima, A., Morisada, N., Shinohara, M., Saito, T., Saito, K., Lai, P.S., Matsuo, M., Awano, H., Morioka, I., Iijima, K., & Nishio, H. (2016) Alternative splicing of a cryptic exon embedded in intron 6 of SMN1 and SMN2. *Hum. Genome Var.*, **3**, 6–8.
- Young, P.J., Day, P.M., Zhou, J., Androphy, E.J., Morris, G.E., & Lorson, C.L. (2002) A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its

- relationship to spinal muscular atrophy. *J. Biol. Chem.*, **277**, 2852–2859.
- Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna, & Nixon, R.A. (2017) Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **9**.
- Zerres, K., Rudnik-Schöneborn, S., Forrest, E., Lusakowska, A., Borkowska, J., & Hausmanowa-Petrusewicz, I. (1997) A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *J. Neurol. Sci.*, **146**, 67–72.
- Zhang, H., Pan, F., Hong, D., Shenoy, S.M., Singer, R.H., & Bassell, G.J. (2003) Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J. Neurosci.*, **23**, 6627–6637.
- Zhang, H., Xing, L., Rossoll, W., Wichterle, H., Singer, R.H., & Bassell, G.J. (2006) Multiprotein Complexes of the Survival of Motor Neuron Protein SMN with Gemins Traffic to Neuronal Processes and Growth Cones of Motor Neurons. *J. Neurosci.*, **26**, 8622–8632.
- Zhao, D.Y., Gish, G., Braunschweig, U., Li, Y., Ni, Z., Schmitges, F.W., Zhong, G., Liu, K., Li, W., Moffat, J., Vedadi, M., Min, J., Pawson, T.J., Blencowe, B.J., & Greenblatt, J.F. (2016) SMN and symmetric arginine dimethylation of RNA polymerase II C-terminal domain control termination. *Nature*, **529**, 48–53.
- Zuluaga Sanchez, S., Purser, M., Mader, G., Gould, I.G., Knight, C., Johnson, N.B., Patel, M., Jensen, J., & Odom, T. (2019) Pro14 Improved Quality of Life and Life-Years in Patients With Infantile-Onset Sma Following Treatment With Nusinersen. *Value Heal.*, **22**, S337.

Anexos

Anexo I: Datos técnicos de los cebadores empleados

Tabla 1. Relación de datos técnicos de los cebadores empleados en el genotipado por PCR.

Línea	Gen	Cebador	Longitud (nucleótidos)	MW	Punto de fusión (°C)	GC (%)	Secuencia (5'-3')
SMAAΔ7	Smn	NeoB	21	6429	70,7	61,9	GCAGCTGTGCTCGACGTTGTC
	Smn	A2F	21	6333	64,9	57,1	GCTCTTGGCAACCCTACTGTC
	Smn	A2R	24	7321	64,3	41,6	CCTTAAAGGAAGCCACAGCCTTAT
Taiwanés	Smn	AGC	21	6473	64,8	52,3	AGCCTGAAGAACGAGATCAGC
	Smn	TGC	20	6213	64,4	55	TGCTCGTGGAAAGTCAGTGAG
	Smn	GCG	20	6123	67,5	45	GCGTTGATGGCATTTCACATA
Taiwanés-SypHy	SMN2	R3499	24	7433	70,1	50	CGAATCACTTGAGGGCAGGAGTTT
	SMN2	R3500	25	7728	71,7	48	AACTGGTGGACATGGCTGTTTCATTG
Taiwanés-SypHy	SypHy	TSypHyR	20	6178	66,5	55	TCATGTGCTCCGTGGATCTC
	SypHy	TSypHyF	20	6075	66,4	55	AGAGGAAAGGCAAAACACAGCC

Anexo II: Datos experimentales

A continuación, se presentan desglosados los datos experimentales del presente trabajo. Los valores de las variables analizadas vienen representados como valor promedio \pm SEM.

Tabla 2. Distancias centro-centro, densidad lineal y diámetro de los granos de Snn en los axones de ratones silvestres (P3).

Parámetro	Valor Medio	n, N
Interdistancias (μm)	$1,95 \pm 0,12$	114, 3
Densidad lineal (μm^{-1})	$0,55 \pm 0,03$	123, 3
Diámetro (nm)	$352,2 \pm 4,3$	75, 3

Tabla 3. Diámetro de los granos correspondientes al marcaje de SMN/Snn por microscopía confocal convencional en los axones de ratones silvestres (P3) y del modelo SMA Δ 7 (P9).

Genotipo	Diámetro (nm)	n, N	P (respecto a silvestre)	Test Estadístico
Silvestre	$352,2 \pm 4,3$	75, 3		Test de Bonferroni
Control	$424,9 \pm 14,5$	90, 4	$< 0,05^{**}$	
SMA Δ 7	$451,7 \pm 11,6$	70, 3	$< 0,005^{***}$	

Tabla 4. Área de Snn en las NMJ de ratones silvestres a distintas edades.

Edad	Área Snn / Área BTX	n, N	P (respecto a P3)	Test Estadístico
P3	$7,37 \pm 0,61$	38, 3		Test de Bonferroni
P6	$7,18 \pm 3,52$	28, 2	$> 0,05$	
P8	$3,34 \pm 0,28$	24, 2	$< 0,005^{**}$	
P10	$1,17 \pm 0,1$	22, 2	$< 0,0005^{***}$	

Tabla 5. Área correspondiente al marcaje de SMN en las NMJ de ratones controles y mutantes SMAΔ7 (P9).

Genotipo	Área SMN / Área BTX	n, N	p (respecto a silvestre)	Test Estadístico
Silvestre	1,17 ± 0,1	38, 3		Test de Bonferroni
Control	6,34 ± 1,63	16, 1	< 0,05*	
SMAΔ7	9,4 ± 2,22	14, 1	< 0,005**	

Tabla 6. Densidad y tamaño de los granos de SMN/Smn por microscopía de superresolución STED en las NMJ de ratones controles y mutantes SMAΔ7 (P9).

Parámetro	Genotipo	Valor Medio	n, N	p	Test Estadístico
Diámetro (nm)	Control	103,4 ± 2,32	73, 2	0,3	<i>t</i> de Student de dos colas
	SMAΔ7	100,31 ± 1,93	77, 2		
Intensidad media (u.a.f.)	Control	499,3 ± 32,13	73, 2	0,0023**	<i>U</i> de Mann-Whitney de dos colas
	SMAΔ7	418,9 ± 34,41	77, 2		
Intensidad máxima (u.a.f.)	Control	830,8 ± 71,62	73, 2	0,76	<i>U</i> de Mann-Whitney de dos colas
	SMAΔ7	966,1 ± 128,8	77, 2		

Nota: En este caso, N indica el número de terminales analizados, habiéndose realizado un único experimento (un ratón por genotipo)

Tabla 7. Intensidad de HuD en las neuronas espinales del asta ventral en ratones controles y mutantes SMA Δ 7 (P9).

Genotipo	Tipo Celular	Intensidad Media (u.a.f.)	n, N	P	Test Estadístico
Control	Chat+	1247 \pm 70,92	158, 4	0,0796	ANOVA de dos factores
	Chat-	920,5 \pm 101,3	69, 3		
SMA Δ 7	Chat+	1203 \pm 769,1	162, 4		
	Chat-	994,9 \pm 172,4	62, 3		

Tabla 8. Densidad de contactos sinápticos excitatorios vGLUT2+ en las motoneuronas espinales en ratones controles y mutantes SMA Δ 7 (P9).

Genotipo	Nº contactos sinápticos / Área motoneurona (μm^{-2})	n, N	% reducción	P	Test Estadístico
Control	0,059 \pm 0,005	43, 3	32 \pm 11	0,0154*	<i>t</i> de Student de dos colas
SMA Δ 7	0,04 \pm 0,003	62, 4			

Tabla 9. Peso corporal de los ratones control y mutante del modelo Taiwanés en función del día postnatal.

Día postnatal	Control		Taiwanés		N	p	Test Estadístico
	Peso (g)	n	Peso (g)	n			
0	1,50 ± 0,03	3	1,33 ± 0,02	5			
1	1,82 ± 0,01	3	1,60 ± 0,05	5			
2	1,93 ± 0,17	6	1,67 ± 0,07	12			
3	2,42 ± 0,16	10	1,98 ± 0,07	17			
4	2,83 ± 0,19	10	2,14 ± 0,07	17		< 0,01**	
5	3,74 ± 0,14	7	2,28 ± 0,12	10		< 0,001***	
6	4,10 ± 0,15	10	2,42 ± 0,09	16		< 0,001***	
7	4,59 ± 0,18	10	2,45 ± 0,09	16	3	< 0,001***	Test de Bonferroni
8	4,81 ± 0,22	6	2,56 ± 0,14	11		< 0,001***	
9	5,81 ± 0,23	10	2,60 ± 0,11	13		< 0,001***	
10	6,42 ± 0,19	10	2,50 ± 0,14	11		< 0,001***	
11	6,75 ± 0,11	10	2,44 ± 0,17	9		< 0,001***	
12	7,20 ± 0,16	10	2,32 ± 0,23	6		< 0,001***	
13	7,68 ± 0,36	7	2,52 ± 0,47	2		< 0,001***	
14	9,11 ± 0,17	3	2,68	1			
15	10,40 ± 0,01	3					

Tabla 10. Tiempo de enderezamiento de los ratones control y mutante del modelo Taiwanés en función del día postnatal.

Día postnatal	Control		Taiwanés		N	p	Test Estadístico
	Enderezamiento (s)	n	Enderezamiento (s)	n			
2	25,22 ± 1,66	3	19,80 ± 3,57	5			
3	11,73 ± 1,86	10	12,96 ± 1,41	17			
4	18,57 ± 2,52	10	14,20 ± 1,83	17			
5	12,19 ± 3,12	7	15,87 ± 2,78	10			
6	16,00 ± 2,92	10	19,71 ± 1,26	16			
7	12,90 ± 3,27	10	12,10 ± 1,44	16			
8	10,67 ± 2,80	6	13,82 ± 2,36	11	3		Test de Bonferroni
9	2,10 ± 0,94	10	16,18 ± 2,56	13		< 0,001***	
10	0,77 ± 0,46	10	14,27 ± 2,50	11		< 0,001***	
11	0,23 ± 0,17	10	9,26 ± 2,35	9			
12	0,07 ± 0,04	10	16,56 ± 4,43	6		< 0,001***	
13	0,05 ± 0,05	7	12,50 ± 0,17	2			
14	0,00 ± 0,00	7	7,30	1			
15	0,00 ± 0,00	7					

Tabla 11. Amplitud del EPP y mEPP, frecuencia de mEPP, fase de subida, constante de tiempo de relajación (τ) y contenido cuántico en los terminales motores de ratones controles y mutantes Taiwanés (P7-10) a 0,5 Hz de estimulación.

Parámetro	Genotipo	Valor Medio	n, N	% reducción	P	Test Estadístico
Amplitud EPP (mV)	Control	27,53 \pm 2,57	50, 7		0,73	<i>t</i> de Student de dos colas
	Taiwanés	29,11 \pm 3,54	53, 8			
Constante de subida (s)	Control	0,92 \pm 0,09	26, 4	-16,3	0,034*	<i>U</i> de Mann-Whitney de dos colas
	Taiwanés	1,07 \pm 0,08	19, 3			
Constante de relajación (s)	Control	3,5 \pm 0,19	24, 4	-37,43	0,039*	<i>U</i> de Mann-Whitney de dos colas
	Taiwanés	4,81 \pm 0,59	16, 3			
Amplitud mEPP (mV)	Control	1,83 \pm 0,12	50, 7	-49,72	0,0048**	<i>t</i> de Student de dos colas
	Taiwanés	2,74 \pm 0,23	53, 8			
Frecuencia mEPP (s ⁻¹)	Control	0,1 \pm 0,03	50, 7		0,054	<i>U</i> de Mann-Whitney de dos colas
	Taiwanés	0,6 \pm 0,01	53, 8			
Contenido Cuántico	Control	14,82 \pm 1,37	50, 7	26,69	0,0138*	<i>t</i> de Student de dos colas
	Taiwanés	10,42 \pm 0,81	53, 8			

Tabla 12. Contenido cuántico máximo, facilitación relativa, número de EPP hasta llegar a la liberación máxima, razón de liberación entre los últimos 40 EPP y el primero y liberación acumulada en los terminales motores de ratones controles y mutantes Taiwanés (P7-10) a 20 Hz de estimulación.

Parámetro	Genotipo	Valor Medio	n, N	% reducción	P	Test Estadístico
Contenido cuántico máximo	Control	30,37 \pm 5,06	19, 5	42,97	0,007	<i>t</i> de Student de dos colas
	Taiwanés	17,32 \pm 1,89	13, 5			
Facilitación (%)	Control	109,6 \pm 2,67	19, 5	-21,44	0,0044	<i>t</i> de Student de dos colas
	Taiwanés	133,1 \pm 8,42	13, 5			
Nº EPP hasta liberación máxima	Control	2,58 \pm 0,84	19, 5	-34,1	0,0092	<i>U</i> de Mann-Whitney de dos colas
	Taiwanés	3,46 \pm 0,97	13, 5			
Contenido cuántico tras STD	Control	13,8 \pm 1,06	19, 5	30,14	0,0121	<i>t</i> de Student de dos colas
	Taiwanés	9,64 \pm 1,05	13, 5			
Razón de liberación 40-80/1º (%)	Control	58,08 \pm 2,26	19, 5	-34,42	0,0084	<i>t</i> de Student de dos colas
	Taiwanés	78,07 \pm 7,95	13, 5			
Cuantos acumulados	Control	1170 \pm 89,56	19, 5	-29,7	0,0118	<i>t</i> de Student de dos colas
	Taiwanés	822,5 \pm 85,73	13, 5			

Tabla 13. Amplitud del incremento de fluorescencia (ΔF) y constante de tiempo de relajación (τ) en los terminales motores de ratones controles y mutantes Taiwanés (P7-10) en ausencia y presencia de glucosa 10 mM.

Glucosa (mM)	Control		Taiwanés	
	10	0	10	0
ΔF_{max}	602,3 \pm 60,64	691,2 \pm 45,53	722,4 \pm 51,96	721,4 \pm 58,22
n, N	53, 9	59, 6	45, 5	35, 5
p (respecto Control 10mM)		0,0108*	0,0047**	0,011*
Constante de relajación (s)	9,88 \pm 0,7	15,53 \pm 1	10,64 \pm 0,69	9,62 \pm 0,64
n, N	53, 9	59, 6	45, 5	35, 5
p (respecto Control 10mM)		<0,0001***	0,298	0,797
Test estadístico	U de Mann-Whitney de dos colas			

Tabla 14. Contenido cuántico del primer pico, frecuencia de mEPP y frecuencia de eventos de liberación asincrónica en los terminales motores de ratones controles y mutantes Taiwanés (P7-10) a 0,5 Hz de estimulación en ausencia y presencia de distintas concentraciones de GV-58.

	Control				Taiwanés			
	0	1	5	20	0	1	5	20
GV-58 (μM)	0	1	5	20	0	1	5	20
Contenido cuántico del primer EPP	12,87 \pm 1,99	14,42 \pm 0,98	12,49 \pm 0,83	12,75 \pm 1,56	12,79 \pm 2,1	10,84 \pm 1,83	16,95 \pm 3,51	17,03 \pm 3,5
n, N	10, 2	9, 2	9, 2	14, 2	14, 2	11, 3	9, 3	7, 2
p	0,7871							
Test estadístico	ANOVA de un factor							
Frecuencia de mEPP (s^{-1})	0,07 \pm 0,01	0,13 \pm 0,03	0,18 \pm 0,03	0,62 \pm 0,09	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,36 \pm 0,1
n, N	10, 2	9, 2	9, 2	14, 2	14, 2	11, 3	9, 3	7, 2
p	<0,0005***	<0,0005***	<0,0005***	<0,0005***	<0,0005***	<0,0005***	<0,0005***	<0,0005***
Test estadístico	Test de Bonferroni							
Frecuencia eventos asincrónicos (s^{-1})	0,1 \pm 0,1	2,47 \pm 0,32	4,24 \pm 0,49	27,93 \pm 5,89	0,43 \pm 0,21	2,47 \pm 0,56	2,93 \pm 0,53	21,9 \pm 4,4
n, N	4, 1	4, 1	6, 1	6, 1	3, 1	6, 1	6, 1	4, 1
p	<0,0005***	<0,005**	<0,0005**	<0,0005**	<0,0005***	<0,0005***	<0,0005***	<0,0005***
Test estadístico	Test de Bonferroni							