



TESIS DOCTORAL

Estudio de los mecanismos
fisiopatológicos de la ruta sináptica de
Neurexinas y Neuroliguinas en la
enfermedad de Alzheimer

Francisco Arias Aragón

Directores de Tesis: Francisco Gómez Scholl, Amalia Martínez Mir

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2023

Memoria presentada por Francisco Arias Aragón para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), bajo la dirección del Doctor Francisco Gómez Scholl y la Doctora Amalia Martínez Mir.

Francisco Arias Aragón ha recibido financiación del Ministerio de Economía y Competitividad, con un Contrato Predoctoral de Personal Investigador en Formación.

El proyecto de investigación ha recibido financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2016-076579).



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Dr. Francisco Gómez Scholl, Profesor Titular de Universidad, adscrito al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que Don Francisco Arias Aragón ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la ruta sináptica de Neurexinas y Neuroliguinas en la enfermedad de Alzheimer” que presenta para optar al grado de doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo.: Francisco Gómez Scholl

Sevilla, 2023

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa asociada con el envejecimiento caracterizada por un deterioro progresivo de la memoria. La pérdida de la función sináptica es un factor temprano que correlaciona con la progresión de la enfermedad, indicando que alteraciones en la función sináptica contribuyen a los mecanismos patogénicos en AD. Las Neurexinas (Nrxns) son proteínas de membrana localizadas en el terminal presináptico con un papel esencial en la función, mantenimiento y regulación de las sinapsis mediante su adhesión con ligandos postsinápticos, como Neuroliginas (Nlgn).

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha obtenido datos que ponen de manifiesto una disfunción del complejo de Nrxns-Nlgn en AD. Mutaciones de pérdida de función en los genes de *Presenilina 1 (PSEN1)* y *Presenilina 2 (PSEN2)* son la causa mayoritaria de los casos de AD familiar (FAD). Las Presenilinas (PS) forman el componente catalítico del complejo γ -secretasa, que interviene en el procesamiento proteolítico de numerosos sustratos. Hemos demostrado previamente que mutaciones en *PSEN1* asociadas a FAD y la inhibición de la actividad del complejo PS/ γ -secretasa produce el acúmulo del fragmento C-terminal no procesado de Nrxns (NrxnCTF) *in vivo* e *in vitro*. En modelos animales con pérdida de función de PS en el cerebro adulto, NrxnCTF se acumula en los terminales presinápticos, coincidiendo con la aparición de defectos tempranos en la plasticidad presináptica y de memoria. Además, el acúmulo selectivo de NrxnCTF en neuronas en cultivo y en el cerebro adulto de ratones transgénicos produce defectos en la liberación de neurotransmisor y de memoria que se asemejan a los defectos ocasionados por una falta de función de PS. Por otro lado, en el grupo se identificó por primera vez una mutación en un gen de Nlgn en un caso de AD, la mutación truncante *NLGN1 Thr271fs*. Con el fin de profundizar en los efectos *in vivo* causados por la alteración del sistema de Nrxns-Nlgn en AD, en esta Tesis Doctoral se ha abordado el estudio de las interacciones entre isoformas de Nrxns y Nlgn en las sinapsis, se han generado y analizado ratones con control temporal de pérdida de función de PS durante el envejecimiento y ratones con una acumulación incrementada de NrxnCTF en un contexto de pérdida de función de PS. Por último, se ha realizado la caracterización bioquímica y comportamental del modelo animal que reproduce la mutación *Nlgn1 Thr271fs* asociada

a AD y se ha desarrollado un modelo animal para el estudio de los efectos de la interacción de Nlgn1 con APP. En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral apoyan un papel del sistema de adhesión trans-sináptico formado por Nrns y Nlgn1 en las alteraciones sinápticas y de memoria en AD.

I. Introducción	10
1 Sistema de adhesión sináptico de Neurexinas y Neuroliginas	1
1.1 Organización general de la sinapsis	1
1.2 Neurexinas	2
1.3 Neuroliginas	4
1.4 Interacción diferencial entre isoformas de Neurexinas y Neuroliginas	5
2 La enfermedad de Alzheimer	7
2.1 Antecedentes de la enfermedad de Alzheimer	7
2.2 Rasgos fisiopatológicos de la enfermedad de Alzheimer	8
2.3 Clasificación de la enfermedad de Alzheimer	8
3 Presenilinas	9
3.1 Presenilinas en la enfermedad de Alzheimer	10
3.2 Funciones biológicas de Presenilinas	12
3.2.1 Funciones de Presenilinas dependientes de actividad γ -secretasa	12
3.3 Sustratos de Presenilinas	13
4 Antecedentes I: Neurexinas como sustratos de Presenilinas, mediadores de defectos presinápticos y de memoria	16
5 Antecedentes II: Papel de Neuroligina 1 en enfermedad de Alzheimer	23
5.1 Identificación de una mutación truncante en <i>NLGN1</i> en un caso de Alzheimer familiar y generación de un ratón <i>knockin</i>	23
5.2 Interacción de APP y Nlgn1	24
II. Objetivos	26
III. Materiales y métodos	28
1 Cultivos celulares	29
1.1 Células HEK 293T	29
1.1.1 Mantenimiento de la línea celular HEK 293T.	29
1.1.2 Transfección de células HEK 293T	29
1.1.3 Producción de partículas lentivirales	30
1.2 Cultivo primario de neuronas hipocámpales de rata.	31
1.2.1 Transfección de cultivos neuronales	31
1.2.2 Infección de cultivos neuronales	32
1.2.3 Co-Cultivo de células HEK 293T con neuronas corticales	32
1.3 Inmunofluorescencia en células en cultivo	32

2	Generación de vectores de expresión y etiquetado con Flag de distintas isoformas de Neurexinas	33
2.1	Etiquetado con Flag en vectores de expresión pCAG	33
2.2	Generación de isoformas de Nrnx en vectores lentivirales de transferencia	35
3	Aspectos generales derivados del empleo de modelos animales	36
3.1	Normativa del uso de animales de experimentación	36
3.2	Población experimental del modelo animal PScKO ^{temp} y PScKO;NrnxCTF	37
3.3	Población experimental del modelo animal Nlgn1 Thr271fs.	37
3.4	Población experimental del modelo animal hAPP _{751SL}	37
3.5	Extracción de DNA genómico y genotipado de ratones.	37
4	Técnicas bioquímicas para el análisis de proteínas	39
4.1	Obtención de tejido para la realización de lisados	39
4.2	Extracción de proteínas a partir de tejido.	39
4.3	Extracción de proteínas a partir de cultivos celulares.	39
4.4	Electroforesis en geles SDS-poliacrilamida y transferencia de proteínas.	40
4.5	Inmunodetección de proteínas	41
4.6	Revelado, toma de imágenes y cuantificación.	41
5	Técnicas para el análisis histológico	42
5.1	Análisis de proteínas en tejido cerebral	42
5.1.1	Perfusión transcardíaca, fijación y corte del tejido	42
5.1.2	Inmunohistoquímica	42
5.1.3	Toma de imágenes y cuantificación	43
5.2	Tinción de Golgi-Cox	44
5.2.1	Procesamiento de las muestras	44
5.2.2	Toma de imágenes y cuantificación de la densidad de espinas dendríticas	45
6	Experimentos de comportamiento en ratones	45
6.1	Condiciones generales para la realización de comportamiento en ratones	45
6.2	Análisis SHIRPA	46
6.3	Evaluación locomotora	46
6.4	Evaluación de estereotipias	47
6.5	Evaluación de preferencia social	47
6.6	Evaluación de la memoria	48
6.6.1	Reconocimiento de objeto nuevo	48
6.6.2	Reconocimiento de objeto desplazado	50
6.6.3	Laberinto de Barnes	50
6.6.4	Condicionamiento al miedo	51

7	Anticuerpos empleados	52
IV.	Resultados	54
1	Interacción Neurexinas-Neuroliguinas	55
1.1	Marcaje de isoformas de α - y β -Nrxn1 mediante la inserción de un epítipo Flag	56
1.2	Interacción diferencial de isoformas de Neurexinas con isoformas de Neuroliguinas en experimentos de co-cultivo	58
1.3	Interacción diferencial de isoformas de Neurexinas con isoformas de Neuroliguinas en un contexto neuronal.	60
2	Control temporal de la función de Presenilina, generación del modelo animal	
PScKO^{temp}		63
2.1	Validación del modelo temporal inducible PScKO ^{temp}	65
2.1.1	Análisis de la escisión de <i>Psen1</i> en el modelo PScKO ^{temp}	65
2.1.2	Procesamiento proteolítico de sustratos de γ -secretasa en el modelo animal PScKO ^{temp}	66
2.1.3	Análisis histológico del cerebro de ratones PScKO ^{young}	67
2.1.3.1	Neurodegeneración en animales PScKO ^{temp}	68
2.1.3.2	Astrogliosis en los animales PScKO ^{young}	69
2.1.3.3	Microgliosis en animales PScKO ^{young}	71
2.2	Análisis del fenotipo asociado con neurodegeneración causado por la pérdida de función de PS en el cerebro envejecido	75
2.2.1	Neurodegeneración en animales PScKO ^{adult}	76
2.2.2	Astrogliosis en los animales PScKO ^{adult}	77
2.2.3	Microgliosis en animales PScKO ^{adult}	77
3	Efecto del incremento específico de los niveles de NrxnCTF en el contexto de pérdida de función de Presenilina	79
3.1.1	Análisis de expresión de NrxnCTF en los animales PScKO;NrxnCTF	80
3.1.2	Análisis histológico de la expresión de NrxnCTF en animales PScKO;NrxnCTF	83
4	Caracterización bioquímica y conductual del modelo animal knockin Nlgn1 Thr271fs	86
4.1	Generación del modelo animal <i>knockin</i> Nlgn1 Thr271fs y caracterización de la expresión de Neuroliguina 1	86
4.2	Caracterización conductual de los animales <i>knockin</i> Nlgn1 Thr271fs	89
4.2.1	Evaluación general del estado del animal	89
4.2.2	Análisis fenotípico de una población adulta de animales <i>knockin</i> Nlgn1 Thr271fs	89
4.2.2.1	Análisis de locomoción exploratoria: Test de campo abierto	90

4.2.2.2	Análisis de patrones repetitivos: Test de acicalamiento-----	91
4.2.2.3	Análisis de interacción social: Test de las tres habitaciones-----	92
4.2.2.4	Evaluación de la memoria -----	93
4.2.2.4.1	Memoria asociativa: Test de condicionamiento al miedo -----	94
4.2.2.4.2	Memoria espacial: Test del laberinto de Barnes -----	95
4.2.2.4.3	Memoria de reconocimiento de objeto nuevo -----	97
4.2.3	Análisis fenotípico de una población envejecida de animales <i>knockin</i> Nlgn1 Thr271fs 100	
4.2.4	Análisis de los defectos de memoria en los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs-----	103
4.3	Caracterización sináptica de los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs-----	106
5	Interacción de Neuroliquina1 y APP-----	108
5.1	Generación modelo animal APP _{751SL} ; Nlgn1 Thr271fs y caracterización general-----	109
5.2	Análisis de la expresión de A β en el modelo animal APP _{751SL} ; Nlgn1 Thr271fs -----	111
5.3	Caracterización de la patología A β en el modelo animal APP _{751SL} ; Nlgn1 Thr271fs -----	111
V.	Discusión-----	114
1	Interacción entre isoformas de Neurexina1 y Neuroliquinas -----	116
2	Análisis de la pérdida de función de Presenilina durante el envejecimiento del cerebro -----	120
3	Impacto del acúmulo específico de NrxnCTF. -----	125
4	Análisis del modelo animal Knockin Nlgn1 Thr271fs, los efectos de una mutación asociada a la enfermedad de Alzheimer -----	129
5	Estudio de la interacción de Neuroliquina1 con APP <i>in vivo</i> -----	135
VI.	Conclusiones -----	139
VII.	Anexos -----	142
1	Análisis electrofisiológico de los animales Nlgn1 Thr271fs -----	143
VIII.	Bibliografía-----	147

I. INTRODUCCIÓN

1 Sistema de adhesión sináptico de Neurexinas y Neuroliginas

1.1 Organización general de la sinapsis

Las sinapsis son conexiones intercelulares altamente especializadas entre células neuronales imprescindibles para la transmisión del impulso nervioso y del correcto funcionamiento del cerebro. La disfunción de las conexiones sináptica subyace a numerosas enfermedades mentales.

Las sinapsis presentan una estructura asimétrica en la que se distinguen tres regiones bien diferenciadas: el terminal presináptico, la hendidura sináptica y el terminal postsináptico. La asimetría en la estructura sináptica da una direccionalidad a la transmisión del impulso nervioso, que va desde el terminal presináptico hacia el terminal postsináptico. La zona activa es la región del terminal presináptico encargada de la liberación de neurotransmisores (Südhof, 2012). En esta zona se concentra la maquinaria de liberación de vesículas y los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCCs). La llegada de un potencial de acción al terminal presináptico provoca la apertura de los VDCCs acompañado de la consecuente entrada de Ca^{2+} , provocando la fusión de las vesículas sinápticas que contienen el neurotransmisor con la membrana, liberando dicho neurotransmisor a la hendidura sináptica (Südhof, 2013). Tras atravesar la hendidura sináptica, el neurotransmisor se une a los receptores situados en la membrana del terminal postsináptico provocando la apertura de canales iónicos en la membrana celular postsináptica y generando cambios en el potencial de ésta, transmitiendo así el impulso nervioso.

En el terminal postsináptico se encuentran los receptores específicos para estos neurotransmisores que, en función de su mecanismo de acción, se pueden clasificar en receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores de tipo ionotrópico forman canales iónicos que, tras la unión del neurotransmisor, sufren un cambio conformacional que desencadena su apertura. Dentro de este conjunto de receptores se han descrito los receptores glutamatergicos tipo AMPA (ácido α amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropionico), NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores de kainato y los receptores GABAérgicos GABA_A . Por otro lado, los receptores metabotrópicos están acoplados a

proteínas G y modulan enzimas y canales iónicos de manera indirecta. Dentro de este grupo se encuentran las familias de los receptores glutamatérgicos mGlu y de los receptores GABAérgicos GABA_B (Pin & Bettler, 2016). La activación tanto de los receptores ionotrópicos como metabotrópicos termina modulando la excitabilidad de la neurona postsináptica, regulando así el balance excitación/inhibición de neuronas individuales y circuitos neuronales.

Las membranas pre- y postsináptica están yuxtapuestas de manera precisa para asegurar la eficacia en la neurotransmisión y deben emparejarse correctamente en función del neurotransmisor liberado (Kandel et al., 2013). Dada la variedad de sinapsis coexistentes en el mismo segmento dendrítico, la organización de los complejos proteicos a ambos lados de la sinapsis está altamente regulada. Las moléculas de adhesión transináptica participan y coordinan el establecimiento sináptico. Entre estos sistemas de adhesión destacan las proteínas sinápticas Neurexinas y Neuroliginas.

1.2 Neurexinas

Las Neurexinas (Nrxns) son proteínas transmembrana tipo I implicadas en la formación, maduración y funcionamiento de las sinapsis. Originalmente fueron descubiertas como receptores de la α -latrotoxina, un componente del veneno de la araña viuda negra (*Latrodectus*) que produce una liberación masiva de neurotransmisores (Ushkaryov et al., 1992). Las Nrxns están codificadas por 3 genes en mamíferos (*NRXN1-3* en humanos y *Nrxn1-3* en ratones). Cada gen tiene dos promotores alternativos lo que da lugar a dos isoformas principales, α Nrxns, isoformas más largas, y β Nrxns, isoformas más cortas (Ushkaryov et al., 1992, 1994; Ushkaryov & Sudhof, 1993). Más recientemente, se ha descrito un promotor alternativo situado hacia el 3' dando lugar a una tercera isoforma codificada únicamente por *NRXN1*, γ -Nrxn (Sterky et al., 2017). La región citoplasmática C-terminal de las distintas isoformas está altamente conservada entre los distintos genes, sin embargo, el dominio N-terminal extracelular es diferente en cada una de las isoformas. α Nrxns constan de una región extracelular que contiene seis dominios laminina-neurexina-globulina de unión a hormona sexual (dominios LNS) y tres dominios de factor de crecimiento epidermal (EGF) (Figura 1). Por otro lado, las isoformas de β Nrxns mantienen en su región extracelular únicamente el último dominio LNS de

α Nrxns. Ambas isoformas contienen entre el último dominio LNS y la región transmembrana, una zona rica en serinas y treoninas donde se produce la O-glicosilación (Reissner et al., 2013; Südhof, 2017) (Figura 1).

Los dominios extracelulares de Nrxns presentan seis sitios de *splicing* alternativo conservados (SP1-SP6), esto eleva las isoformas posibles a más de 1000 y crea una gran diversidad presente por todo el cerebro, contribuyendo así a la diversidad sináptica (Südhof, 2017; Uchigashima et al., 2019; Ullrich et al., 1995). Los sitios de *splicing* SP4 y SP5 están presentes en las isoformas de α - y β Nrxns, mientras que los sitios SP1, SP2, SP3 y SP6 son específicos de α Nrxns (Ullrich et al., 1995; Ushkaryov et al., 1992). La isoforma γ Nrxn únicamente contiene el SP5 (Sterky et al., 2017). Las isoformas producidas por la presencia o ausencia de los distintos sitios de *splicing* se conocen como SPX o Δ X, respectivamente (Figura 1).

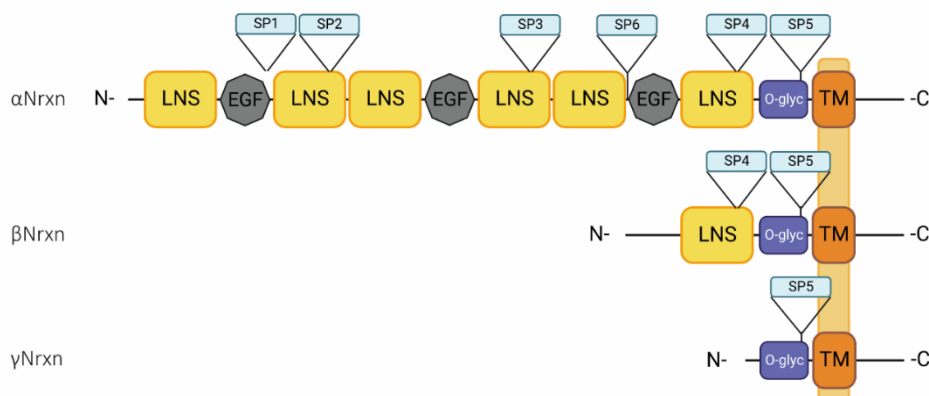


Figura 1. Representación esquemática de las distintas isoformas de Nrxns. LNS: dominio Laminina/Neurexina/Globulina de unión a hormona sexual; EGF: factor de crecimiento epidermal; O-glyc: sitio de O-glicosilación; TM: dominio transmembrana; SP: sitio de *splicing* alternativo. Figura realizada con Biorender.com.

La localización subcelular de Nrxns es mayoritariamente presináptica, jugando un papel esencial en la neurotransmisión y en la diferenciación de las sinapsis mediante las uniones con proteínas a ambos lados de las mismas. En la zona cercana al dominio transmembrana de la región común intracelular de Nrxns, se ha descrito un dominio de unión a proteína 4.1, actuando de anclaje al citoesqueleto de actina de la membrana plasmática (Biederer & Südhof, 2001). En el extremo C-terminal intracelular, las Nrxns presentan un sitio de unión a proteínas con dominio PDZ, a través del cual interactúan con los complejos proteicos de andamiaje del terminal presináptico como el compuesto por CASK (*calcium/calmodulin dependent serine protein kinase*), Mint y Veli (Butz et al., 1998). Por otro lado, el dominio N-terminal extracelular de Nrxns es muy variable y regula la interacción con diferentes proteínas postsinápticas. De esta manera, Nrxns median la

adhesión trans-sináptica reclutando ligandos postsinápticos y regulando la liberación de neurotransmisores desde el dominio citoplasmático (Dai et al., 2022; Rabaneda et al., 2014; Siddiqui et al., 2010; Südhof, 2017). Entre los ligandos de Nrns destacan neuroliginas (Nlgn), proteínas LRRTM, neuexofilinas, distroglicanos y cerebelinas.

1.3 Neuroliginas

Las Nlgn son proteínas transmembrana de tipo I que se descubrieron como receptores postsinápticos de Nrns en el grupo de Dr. Thomas C. Südhof, quienes observaron que se unían al dominio extracelular de β Nrxn1 en presencia de Ca^{2+} (Ichtchenko et al., 1995). Posteriormente, en experimentos de co-cultivos, se confirmó la capacidad sinaptogénica de Nlgn1 cuando, expresada en células no neuronales, indujo una diferenciación presináptica en neuronas hipocámpales (Scheiffele et al., 2000). En humanos existen cinco genes que codifican Nlgn (*NLGN1-4X* y *4Y*) y cuatro en ratón (*Nlgn1-4*). Las Nlgn presentan un dominio extracelular con un único dominio homólogo a acetilcolinesterasa (AChE) sin actividad catalítica, un dominio transmembrana y un dominio C-terminal intracelular corto (Figura 2). Se han descrito dos sitios de *splicing* alternativo, ambos en el dominio AChE. Todas las Nlgn comparten el sitio de *splicing* alternativo A, y Nlgn1 contiene un sitio de *splicing* adicional B (Boucard et al., 2005; Chih et al., 2006; Ichtchenko et al., 1996).

En el extremo C-terminal intracelular las Nlgn presentan un sitio de unión a dominios PDZs, mediante el cual interactúan con proteínas de andamiaje del terminal postsináptico, como PSD-95 (*postsynaptic density protein 95*) o Gephyrina (Graf et al., 2004; Irie et al., 1997).

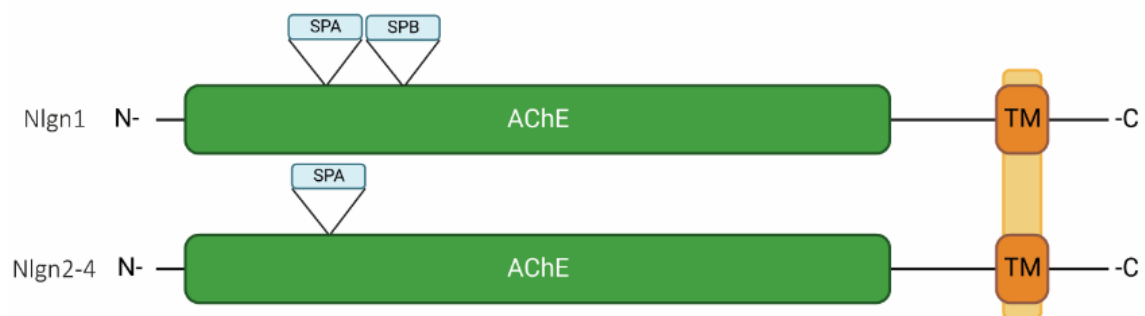


Figura 2. Representación esquemática de las distintas isoformas de Nlgn. SP: sitio de *splicing* alternativo; AChE: dominio acetilcolinesterasa; TM: dominio transmembrana. Figura realizada con Biorender.com

1.4 Interacción diferencial entre isoformas de Neurexinas y Neuroliginas

Gracias a experimentos de inmunolocalización se ha descubierto una distribución diferencial de las distintas Nlgn en diferentes tipos de sinapsis. Por un lado, Nlgn1 está presente en sinapsis excitatorias (Song et al., 1999), donde, mediante el motivo de unión a dominios PDZ se une a PSD-95, proteína de andamiaje postsináptico (Irie et al., 1997) y de manera indirecta se une a *Shank* (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains*) (Naisbitt et al., 1999). Por otro lado, Nlgn2 está presente en sinapsis inhibitorias, donde interacciona con la proteína de andamiaje postsináptico Gefirina (Ali et al., 2020; Graf et al., 2004; Pouloupoulos et al., 2009; Varoqueaux et al., 2004). Por otro lado, Nlgn3 se ha detectado tanto en sinapsis glutamatérgicas como GABAérgicas (Budreck & Scheiffele, 2007).

La distribución diferencial de las diferentes Nlgn en los distintos tipos de sinapsis concuerda con la actividad funcional observada. Mientras que una sobreexpresión de Nlgn1 en cultivos neuronales induce una formación de sinapsis glutamatérgicas con presencia de PSD-95, la expresión de Nlgn2 induce una formación de sinapsis GABAérgicas que contienen Gefirina (Chih et al., 2006). Las observaciones realizadas *in vivo* también concuerdan con esta distribución asimétrica de las distintas Nlgn en las sinapsis. El ratón *knockout* (KO) de *Nlgn1* presenta defectos en la transmisión sináptica glutamatérgica, observándose una reducción en el ratio NMDA/AMPA y en la potenciación a largo plazo (LTP) (Blundell et al., 2010; Jedlicka et al., 2015). Por otro lado, el ratón KO de *Nlgn2* presenta un descenso en la respuesta sináptica inhibitoria (Babaev et al., 2016; Chubykin et al., 2007).

La interacción entre Nrxns y Nlgn está regulada por los eventos de *splicing* alternativo que sufren ambos grupos de proteínas. La presencia del *splicing* B en Nlgn1 restringe la interacción a las isoformas de β Nrxn Δ 4, impidiendo su interacción con α Nrxns o β NrxnSP4. Sin embargo, Nlgn1 sin el *splicing* B y Nlgn2, que carece de este sitio de *splicing*, son capaces de unirse tanto a α - como a β Nrxns independientemente de la presencia o no del SP4 (Boucard et al., 2005; Chih et al., 2006; Koehnke et al., 2010; Miller et al., 2011).

La interacción de α Nrxns y β Nrxns con dímeros de Nlgn a través del espacio sináptico regula importantes aspectos del establecimiento, diferenciación y maduración

de la sinapsis. En sinapsis glutamatérgicas, Nlgn1 aumenta la densidad sináptica y la probabilidad de liberación de neurotransmisores mediante un mecanismo dependiente de su interacción con Nrns (Chih et al., 2006; Dean, Scholl, Choih, Demaria, et al., 2003).

La identificación de otras proteínas de adhesión sináptica en los últimos años revela la existencia de mecanismos alternativos que cooperan con el sistema Nrns-Nlgn en la formación y función sináptica. Destacan otros ligandos postsinápticos de Nrns como LRRTMs (*Leucine-rich-repeat transmembrane*), proteínas transmembrana que se unen a Nrns en la ausencia del SP4 durante la formación de sinapsis glutamatérgicas (Ko et al., 2009; Siddiqui et al., 2010). Se ha descrito la unión selectiva a isoformas de Nrns Δ 4 por parte de otros ligandos como distroglicanos y latrofilinas (Boucard et al., 2012; Reissner et al., 2014). Del mismo modo, existen moléculas de unión específica a α Nrns o β Nrns. Por ejemplo, las proteínas postsinápticas Calsinténinas se unen a α Nrns e inducen la formación de sinapsis excitatorias e inhibitorias sobre interneuronas, aunque más recientemente se ha descrito la unión de Calsinténinas tanto a α Nrns como a β NrnsSP4 regulando la sinapsis excitatoria en las fibras de Schaffer en el hipocampo (H. Kim et al., 2020).

Se han descubierto mecanismos adicionales mediados por moléculas de secreción que hacen de puente entre Nrns y proteínas postsinápticas. Las cerebelinas (Cblns), glicoproteínas que conectan NrnsSP4 con el receptor GluD2 (S.-J. Lee et al., 2012). Por otro lado, la proteína Hevin secretada por los astrocitos hace de puente entre α Nrns y Nlgn1 con el sitio de *splicing* B, isoformas que en otras condiciones no interaccionarían, actuando así de modulador positivo (Fan et al., 2021; Singh et al., 2016). También se ha descrito la existencia de moduladores negativos, como la familia de proteínas MDGA. La proteína MDGA1 bloquea la interacción de Nlgn2 con Nrns suprimiendo el desarrollo de las sinapsis inhibitorias en neuronas en cultivo (Pettem, Yokomaku, Luo, et al., 2013), mientras que la proteína MDGA2 bloquea la interacción entre Nlgn1 y 2 con Nrns modulando así negativamente el desarrollo de sinapsis tanto excitatorias como inhibitorias (Connor et al., 2016). La interacción de MDGA1 también se ve afectada por la presencia o ausencia del sitio B de *splicing* en Nlgn1, siendo capaz de bloquear la capacidad sinaptogénica de Nlgn1 únicamente cuando esta no tiene el sitio de *splicing* B (Elegheert et al., 2017). Por lo tanto, aunque los diferentes sitios de *splicing* presentes tanto en Nrns como en Nlgn regulan su interacción, existe un complejo grupo de

proteínas que actúan como moduladoras y mediadoras entre las isoformas de *splicing* que normalmente no interactuarían, lo que acompleja aún más el sistema de interacción Nrxns-Nlgns.

El amplio número de proteínas de adhesión sináptica descubierto hasta la fecha, y las complejas interacciones que existen entre ellas, indica la importancia de su función y sugiere la existencia de una redundancia parcial en los circuitos neuronales. En otras palabras, los efectos de la ausencia de una de estas proteínas dependerán del papel específico que desempeñen, así como de la compensación funcional que puedan ofrecer sistemas alternativos con funciones solapantes en la misma sinapsis. Es decir, se pueden dar mecanismos compensatorios para mantener la función sináptica adecuada.

2 La enfermedad de Alzheimer

La demencia es el término genérico empleado para abarcar una serie de síntomas deficitarios en las habilidades cognitivas de gravedad suficiente como para interferir en las actividades diarias de los pacientes. La enfermedad de Alzheimer (AD) es la forma más frecuente de demencia con una prevalencia de alrededor 50 millones de personas en todo el mundo, proyectado a triplicarse para el año 2050 (Scheltens et al., 2021). Es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al lenguaje, memoria, comprensión, atención y razonamiento, siendo el síntoma más común la pérdida de memoria a corto plazo. El desarrollo de la enfermedad antes de los 65 años se considera un inicio temprano y es poco frecuente, representando menos del 10% de los pacientes con AD (Kumar et al., 2022).

2.1 Antecedentes de la enfermedad de Alzheimer

El psiquiatra alemán Alois Alzheimer describió originalmente AD en 1907, publicando su investigación en el artículo titulado “Sobre una enfermedad grave y peculiar de la corteza cerebral”. En este artículo describió a una mujer de 51 años, Auguste Deter, con síntomas de paranoia, problemas de retención de información, problemas de atención, agresividad, mala comprensión y comunicación. La paciente falleció tras cuatro años y medio de enfermedad. Tras un análisis histológico del cerebro,

Alois Alzheimer describió una atrofia cerebral, la presencia de depósitos extracelulares dispersos por toda la corteza, agregados neurofibrilares y cambios en las células gliales (Strassnig & Ganguli, 2005). En 1910, otro psiquiatra alemán, Emil Kraepelin, nombró esta nueva entidad clínica y patológica como enfermedad de Alzheimer, nombre que se sigue empleando hoy en día.

2.2 Rasgos fisiopatológicos de la enfermedad de Alzheimer

En el cerebro de los pacientes con AD se han descrito dos estructuras subcelulares características, las placas de β amiloide ($A\beta$) y los ovillos neurofibrilares.

$A\beta$ se produce por el procesamiento secuencial del precursor de la proteína β amiloide (APP) por parte de la β - y γ -secretasa, y tiene una longitud típica de 38, 40 y 42 aminoácidos (Haass et al., 2012). Estos péptidos $A\beta$ tienden a agregar entre ellos formando oligómeros, protofibrillas y fibrillas, que son detectables en los cerebros de pacientes de AD. Debido a la mayor hidrofobicidad proveniente del fragmento C-terminal más largo, $A\beta_{42}$ tiene mayores capacidades de agregación (Long & Holtzman, 2019).

Los ovillos neurofibrilares son otro tipo de agregados compuestos, principalmente, por la proteína Tau fosforilada. La proteína Tau en situaciones fisiológicas se encuentra asociada a los microtúbulos proporcionando estabilidad al citoesqueleto de las neuronas facilitando el mantenimiento de la estructura celular y el transporte vesicular. Cuando esta proteína se hiperfosforila, se disocia de los microtúbulos y comienza a formar agregados proteicos (Rawat et al., 2022).

2.3 Clasificación de la enfermedad de Alzheimer

AD se puede clasificar en dos tipos dependiendo de sus factores genéticos:

- AD esporádica. Se clasifica dentro de este tipo las enfermedades que debutan de manera más tardía, generalmente después de los 65 años de edad. Representa un 90-95% del total de los enfermos de AD y no presenta un patrón claro de herencia.
- AD familiar (FAD). Es una enfermedad de inicio más temprano, con una aparición entre los 30 y 65 años generalmente. Representa entre el 5 y el 10% del total de

pacientes con AD. Presenta un patrón de herencia autosómica dominante y está asociada a mutaciones en numerosos genes. Entre los más importantes destacan *APP*, en el cromosoma 21; *Presenilina 1 (PSEN1)*, en el cromosoma 14 y *Presenilina 2 (PSEN2)*, en el cromosoma 1 (Selkoe, 2001), siendo las mutaciones en los genes de *PSEN* las que abarcan hasta el 90% de los casos descritos de FAD. La identificación mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* en FAD ha supuesto un gran avance en el estudio de mecanismos fisiopatológicos asociados con AD.

3 Presenilinas

Las Presenilinas (PS1 y PS2) son proteínas transmembrana multipaso con actividad catalítica proteasa de unos 50 KDa. Representan la subunidad catalítica del complejo γ -secretasa y tienen un papel importante en la aparición y progresión de AD (Stanga et al., 2018). El complejo γ -secretasa está formado por la asociación de PS1 o PS2 con otras tres proteínas de membrana: Nicastrina, Aph-1 (Aph1a o Aph-1b en humanos; Aph1a, Aph-1b o Aph-1c en roedores) y Pen-2, dando lugar esta combinación a cuatro y seis γ -secretasas distintas en humanos y roedores, respectivamente (Dehury et al., 2019; Wolfe & Miao, 2022).

La formación del complejo activo γ -secretasa comienza con la incorporación de PS al dímero formado por Aph1 y Nicastrina. A continuación, y tras la unión de PS al dominio transmembrana de Nicastrina, se ensambla Pen-2 a PS, teniendo lugar la endoproteólisis de PS para formar el complejo activo PS/ γ -secretasa (Thinakaran et al., 1996). El proceso de endoproteólisis de PS da lugar a los fragmentos NTF y CTF de PS de 27-20 kDa y 16-20 kDa, respectivamente (Dehury et al., 2019). La actividad proteolítica de PS está mediada por dos residuos de aspartato en las posiciones 257 y 385 localizados en el sexto y séptimo dominio transmembrana, respectivamente. Estos residuos son esenciales para la actividad endoproteolítica de PS y, por tanto, para la actividad γ -secretasa (Kimberly et al., 2000; Wolfe et al., 1999).

La localización subcelular del complejo γ -secretasa viene determinado por la presencia de PS1 o PS2. Por un lado, si está presente PS1, el complejo γ -secretasa se localiza principalmente en la membrana plasmática, mientras que, si es PS2 la presente,

este se localiza en la red retículo endoplásmico-Golgi y en los endosomas de reciclaje. Además, la localización subcelular se puede ver afectada por el componente Aph1, pudiendo localizarse en compartimentos endocíticos tardíos (Meckler & Checler, 2016). La distinción entre complejos con PS1 o PS2 puede tener importantes implicaciones en la especificidad de sustratos de estos. Por ejemplo, los complejos PS1/ γ -secretasa juegan un papel predominante en el procesamiento de APP y Notch comparado con los que contienen PS2 (Stanga et al., 2018).

3.1 Presenilinas en la enfermedad de Alzheimer

Actualmente se conocen más de 300 mutaciones en *PSEN1* asociadas con FAD (www.alzforum.org). Las mutaciones en *PSEN1* no están concentradas en una región específica del gen, sino que se distribuyen a lo largo de toda su secuencia. Se localizan principalmente en el gran lazo hidrofílico, en las zonas cercanas o en las interfases con la membrana, o en los dominios transmembrana altamente conservados. (Kabir et al., 2020) (Figura 3).

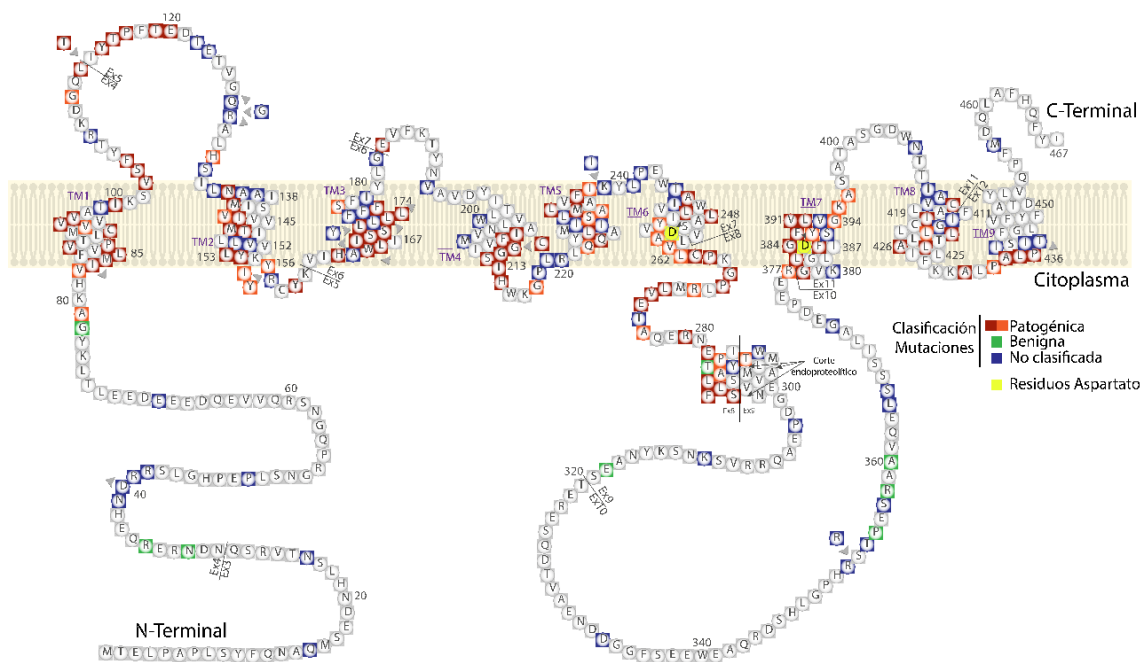


Figura 3. Mutaciones descritas en *PSEN1*. En la imagen se muestra la distribución de las distintas mutaciones descritas en el gen *PSEN1*. Se incluyen mutaciones de cambio de sentido, pequeñas inserciones y deleciones. En rojo, mutaciones patogénicas en PS1. En verde, mutaciones benignas y en azul mutaciones no clasificadas. En amarillo, los dos residuos de Aspartatos (D257 y D385) pertenecientes al sitio catalítico de PS1. Alzforum.com, Versión 4.7-2023.

El patrón de herencia autosómica dominante en las mutaciones en genes de PS asociadas con FAD se puede explicar desde dos puntos de vista: por un lado, estas mutaciones actuarían produciendo una ganancia de función, con una sobreproducción

de productos del procesamiento (Hardy & Selkoe, 2002). Por otro lado, las mutaciones en *PSEN* podrían generar una pérdida de función, con el consecuente acúmulo de sustratos (Shen & Kelleher III, 2007). Resolver esta dicotomía tiene implicaciones clínicas relevantes. En el caso de que las mutaciones en *PSEN* causaran una ganancia de función, la inactivación de la actividad de PS o del complejo γ -secretasa podría aliviar la sintomatología o el avance de AD. Por el contrario, si nos encontráramos ante mutaciones de pérdida de función, sería importante encontrar aproximaciones farmacológicas que impidieran la acumulación de sustratos posiblemente patogénicos para frenar el desarrollo de la AD.

Trabajos realizados en los últimos años apoyan un mecanismo que actúa a través de mutaciones de pérdida de función de PS. Por un lado, las mutaciones en *PSEN* asociadas a FAD se encuentran distribuidas a lo largo de toda la secuencia de la proteína, por tanto, es difícil imaginar un escenario en el que dichas mutaciones confieran una ganancia de función. En un estudio reciente se han analizado *in vitro* 138 mutaciones patogénicas en *PSEN1* relacionadas con FAD y como influyen en la producción del péptido A β . Sorprendentemente, el 90% de las mutaciones estudiadas redujeron el procesamiento de APP, observándose una menor generación de A β_{40} y A β_{42} (Sun et al., 2017). Este estudio reveló que las mutaciones patogénicas en *PSEN1* inhibían, en lugar de incrementar, la actividad del complejo PS/ γ -secretasa. Por otro lado, se han realizado estudios *in vivo* donde se induce la pérdida de función de PS. Los animales PS cKO son uno de los modelos más estudiados que apoyan el mecanismo de pérdida de función de PS. En este modelo animal, la inactivación de PS ocurre en las neuronas glutamatérgicas del cerebro adulto a partir de las cuatro semanas de edad. Los estudios realizados en los animales PS cKO han reportado defectos tempranos en la plasticidad presináptica y de memoria (Saura et al., 2004; Wines-Samuels et al., 2010). Resultados similares se han obtenido con la inhibición de otro de los componentes del complejo γ -secretasa como Nicastrina (Tabuchi et al., 2009). Además, la asociación de mutaciones de pérdida de función de PS con AD se ha visto reforzada por la generación de modelos de ratón *Knock-in* (KI) donde se reproducen mutaciones en *PSEN1* asociadas a FAD (Guo et al., 1999; Xia et al., 2015, 2016).

Apoyando este mecanismo de pérdida de función, ensayos clínicos en fase III que trataban pacientes con inhibidores de la actividad PS/ γ -secretasa han tenido que ser

cancelados debido al incremento en la incidencia de los efectos adversos en los pacientes tratados (Doody et al., 2013).

En conjunto, estos datos han llevado a postular la “hipótesis de Presenilinas”, según la cual la pérdida de función de PS, con el consecuente acúmulo de sus sustratos, sería la que tendría un papel iniciador en AD ocasionando defectos sinápticos y de memoria precedentes a la posterior neurodegeneración en pacientes (Shen & Kelleher III, 2007).

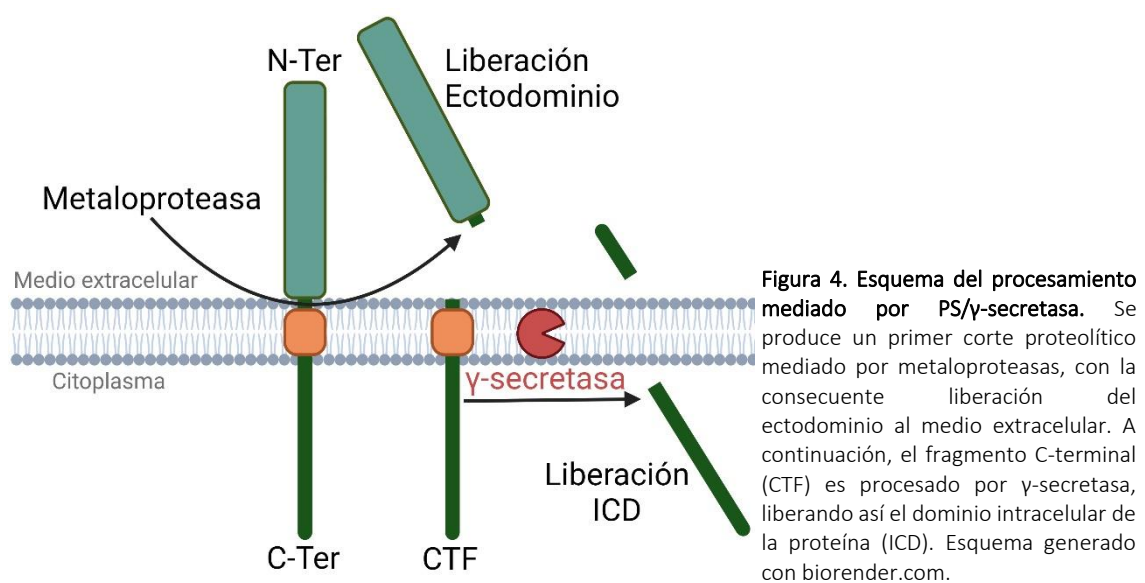
3.2 Funciones biológicas de Presenilinas

PS son el centro activo del complejo γ -secretasa y se descubrieron a consecuencia de sus funciones en la generación del péptido A β asociado a AD. Desde su descubrimiento se han identificado numerosos sustratos y proteínas con las que interaccionan, indicando que deben tener diversas funciones a lo largo de la vida (Haapasalo & Kovacs, 2011). Las funciones de PS se pueden clasificar en base a la participación o no del complejo γ -secretasa. Dentro de las funciones independientes de la actividad γ -secretasa, se encuentran la estabilización de β -catenina en la ruta de señalización de Wnt (Duggan & McCarthy, 2016; H. Huang & He, 2008) y la activación de canales de Ca^{2+} y regulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (H. Zhang et al., 2010, 2015). Debido a la importancia y relación con los objetivos de esta Tesis Doctoral, las funciones de PS dependientes de actividad γ -secretasa se describen en detalle a continuación.

3.2.1 Funciones de Presenilinas dependientes de actividad γ -secretasa

La función del complejo PS/ γ -secretasa es el procesamiento proteolítico de diversos sustratos. Estos sustratos son mayoritariamente proteínas integrales de membrana tipo I (S. Zhang et al., 2013). Los sustratos de PS tienen funciones importantes en rutas de señalización, adhesión celular y migración, crecimiento de neuritas y formación de la sinapsis. El procesamiento por parte del complejo PS/ γ -secretasa, una vez desprendido el ectodominio del sustrato (Struhl & Adachi, 2000), tiene lugar en el límite entre los dominios transmembrana y citoplasmático o en sus inmediaciones (Figura 4). Además, parece que el corte por parte de PS/ γ -secretasa no depende de una secuencia específica de aminoácidos, sino más bien, de la conformación del dominio transmembrana del sustrato (Weihofen & Martoglio, 2003). A consecuencia del corte

producido por el complejo PS/ γ -secretasa, se genera un dominio intracelular (ICD) que es liberado en el citosol (Figura 4). Se ha descrito que algunos de estos ICDs se translocan al núcleo, sugiriendo una posible función en la regulación génica (Araki et al., 2004; Okochi et al., 2002). La generación del ICD es consecuencia directa de la función del complejo γ -secretasa, ya que una falta de función de PS/ γ -secretasa, bien por el empleo de inhibidores farmacológicos o por mutaciones en PS, previenen la formación de los ICDs y producen el acúmulo consecuente de los CTFs no procesados (Haapasalo & Kovacs, 2011).



3.3 Sustratos de Presenilinas

Hay descritos una gran variedad de sustratos de PS/ γ -secretasa con diferencias en función biológica, estructura y localización celular. Desde la caracterización molecular del complejo PS/ γ -secretasa en 1999 (Wolfe et al., 1999), se han descrito casi 150 sustratos diferentes (Güner & Lichtenthaler, 2020). Generalmente se asume que el procesamiento por parte del complejo γ -secretasa contribuye a uno de los siguientes propósitos o combinación de estos: regulación de los niveles de las proteínas sustrato mediante su degradación, transducción de señal mediante la liberación del ICD o liberación de un péptido pequeño que pueda tener función fisiológica.

El procesamiento del receptor Notch es un ejemplo de señalización inducida mediante el procesamiento por parte de PS/ γ -secretasa (de Strooper et al., 1999;

Hartmann et al., 2002). Notch es una proteína de membrana cuya función como factor de activación transcripcional requiere del procesamiento por parte del complejo PS/ γ -secretasa. Tras ser procesado se vuelve transcripcionalmente activo. El proceso de activación de Notch tiene importantes funciones durante el desarrollo (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Es interesante destacar que el procesamiento de Notch por parte de PS parece no ser homogéneo durante la edad de los animales. Durante el desarrollo embrionario de animales con pérdida de función de PS se observa un bloqueo en la cascada de señalización mediada por Notch dependiente de su procesamiento (W. Y. Kim & Shen, 2008). Sin embargo, animales PS CKO adultos, no se observan alteraciones en la cascada de señalización de Notch, mientras que el resto de los sustratos de PS sufren un claro acúmulo debido a su falta de función (Huakui Yu et al., 2001).

Por otro lado, uno de los sustratos de PS/ γ -secretasa que ha obtenido una gran relevancia en relación con AD es la proteína precursora del péptido β amilode (APP). APP es una glicoproteína transmembrana tipo I que al ser procesada proteolíticamente genera el péptido $A\beta$. APP se encuentra muy conservado evolutivamente y, mediante *splicing* alternativo, se generan al menos 10 isoformas diferentes, apuntando a un potencial papel en la fisiología de la célula (Cho et al., 2022). Las isoformas más abundantes son las que contienen 695, 751 y 770 aminoácidos (Selkoe, 2001). APP puede ser procesado por tres tipos distintos de proteasas: α -, β -, y γ -secretasa. Existen dos vías de procesamiento de APP: la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, el procesamiento comienza con un corte por parte de α -secretasa en el dominio extracelular, generando un fragmento N-terminal de APP soluble (sAPP α) y un fragmento C-terminal de 83 aminoácidos (C83). El CTF es procesado por la γ -secretasa en su dominio transmembrana generando un péptido de 23 aminoácidos (p3) que se libera al medio extracelular y un fragmento citosólico correspondiente al dominio intracelular de APP (AICD). En la vía no amiloidogénica no se genera el péptido $A\beta$ ya que sitio de corte de la α -secretasa se encuentra en la secuencia aminoacídica del mismo (Checler, 1995; Papadopoulos et al., 2022). La proteína ADAM13, ADAM10 y ADAM9 han sido propuestas como responsables de la actividad α -secretasa encargada del procesamiento no amiloidogénico de APP (Haass et al., 2012).

En la ruta amiloidogénica, APP es procesado por β -secretasa, generando el extremo soluble N-terminal (sAPP β) y un CTF asociado a membrana de 99 aminoácidos (C99). Este

CTF es procesado por el complejo γ -secretasa generando el péptido A β y un fragmento AICD (Papadopoulos et al., 2022; Takami et al., 2009). Como proteína con actividad β -secretasa se ha identificado a la proteína BACE1 (Lichtenthaler et al., 2022; Vassar et al., 1999). El péptido A β puede formar agregados en forma de oligómeros en determinadas circunstancias, los cuales son capaces de polimerizar en grandes depósitos de fibras que pueden llegar a formar placas asociadas a astrogliosis y microgliosis (Armstrong, 2009).

Por último, se han descrito sustratos del complejo γ -secretasa con dominios citoplásmicos mucho más cortos, lo que parece indicar que su ICD no tenga función de señalización, al menos conocida. Al igual que el ICD, se desconoce si el segundo producto del complejo γ -secretasa, el péptido corto y secretado tipo A β , tiene alguna función fisiológica. A β tiene una función establecida en la fisiopatología de AD y mutaciones en *APP*, *PSEN1* o *PSEN2* producen una herencia dominante de formas de FAD. Algunas mutaciones asociadas con FAD producen una mayor generación del péptido A β_{42} (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Moehlmann et al., 2002). Estos datos sirven de apoyo para la postulación de la teoría amiloidogénica, que apoya la producción masiva de formas largas del péptido A β como A β_{42} como principal responsable de AD (Hardy & Selkoe, 2002). Sin embargo, no está claro que PS promueva los déficits de memoria y supervivencia neuronal mediante el procesamiento de APP, poniendo en duda si este es el único sustrato patogénico del complejo γ -secretasa. Por ejemplo, pacientes que poseen mutaciones en *APP* desarrollan la enfermedad de manera más tardía que pacientes con mutaciones en los genes de *PSEN* (Ryman et al., 2014). Por otro lado, en estudios *post mortem* y de imagen en vivo empleando PET se han encontrado que pacientes con pocos o ningún síntoma clínico de demencia presentaban elevados niveles de placas amiloides (Klunk et al., 2009). Estos datos indican que el péptido A β no es suficiente para causar AD. La mera sobreproducción de A β , incluyendo la forma larga A β_{42} , no causa neurodegeneración en modelos animales (Mucke et al., 2000), sugiriendo que la sobreproducción de A β puede no ser suficiente para el inicio de la neurodegeneración (J. Kim et al., 2013). Por otro lado, en modelos animales KI con mutaciones en *Psen1* asociadas a FAD se observa una reducción en los niveles de A β_{40} y A β_{42} , lo que concuerda con mecanismos de pérdida de función de PS (Tambini & D'Adamio, 2020; Xia et al., 2016). Se propone así dos rutas paralelas relacionadas con AD, una que depende de la producción de A β ocasionando la formación de placas, y otra,

independiente del péptido A β causando la mala función sináptica, el deterioro cognitivo y de memoria y la neurodegeneración dependiente de la edad.

En conjunto, las evidencias encontradas en humanos y en modelos animales ponen en entredicho el papel exclusivo del acúmulo de A β postulado por la teoría amiloidogénica como explicación a la enfermedad (Herrup, 2015). Aunque no se descarte completamente el papel patológico de A β , el progreso en la investigación de AD pasa por la identificación de nuevos sustratos de PS que puedan tener un impacto sobre la modulación de la enfermedad. La identificación de estos nuevos sustratos como posibles responsables de la disfunción sináptica y neurodegeneración causada por la pérdida de función de PS podrían proporcionar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del desarrollo de AD (Ho & Shen, 2011).

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha identificado como sustrato sináptico de PS/ γ -secretasa a Nrns (Saura et al., 2011; Servián-Morilla et al., 2018). Además, hemos demostrado que el acúmulo *in vivo* del NrnsCTF produce defectos en plasticidad presináptica y en la memoria asociativa (Sánchez-Hidalgo et al., 2022).

4 Antecedentes I: Neurexinas como sustratos de Presenilinas, mediadores de defectos presinápticos y de memoria

Los resultados descritos a continuación fueron publicados por nuestro grupo en el artículo titulado “*Presenilin/ γ -secretase regulates Neurexins processing at synapses*” en Plos One (Saura et al., 2011).

En este artículo se demostró que Nrns son procesadas primero por una actividad metaloproteasa y, posteriormente, por el complejo PS/ γ -secretasa (Saura et al., 2011). Se realizaron experimentos *in vitro* empleando células HEK 293T que expresaban β Nrns1. Empleando un inhibidor farmacológico de la actividad de PS (DAPT) se observó un acúmulo del CTF de Nrns (NrnsCTF) (Saura et al., 2011). El procesamiento por parte de PS es un evento generalizado en Nrns y se observó en diferentes isoformas, como α Nrns1 y β Nrns2 (Figura 5).

Tras la demostración en sistemas heterólogos, en el análisis del procesamiento de Nrns en neuronas hipocampales en cultivo, se detectó un acúmulo de los NrnsCTFs

endógenos tras emplear el inhibidor DAPT, resultado que se reprodujo en neuronas que expresaban PS con una mutación dominante negativa (D385A) (Saura et al., 2011). Además, se observó un incremento de los NrnxCTFs en lisados provenientes de cerebros de embriones PS1 $-/-$ y de cerebro adulto de animales PS cKO (Saura et al., 2011). Se realizaron purificaciones de fracciones de sinaptosomas provenientes de corteza en animales controles y PS cKO , donde se observó un acúmulo de NrnxCTF preferente en el terminal presináptico (Figura 5).

Estos resultados indican que PS se encarga del procesamiento sináptico de Nrnxns generando el fragmento NrnxCTF dependiente de la actividad γ -secretasa. Estos datos van en consonancia con la localización presináptica de PS y de algunos de sus sustratos como APP-CTF descritos previamente (Saura et al., 2005; C. Zhang, Wu, et al., 2009).

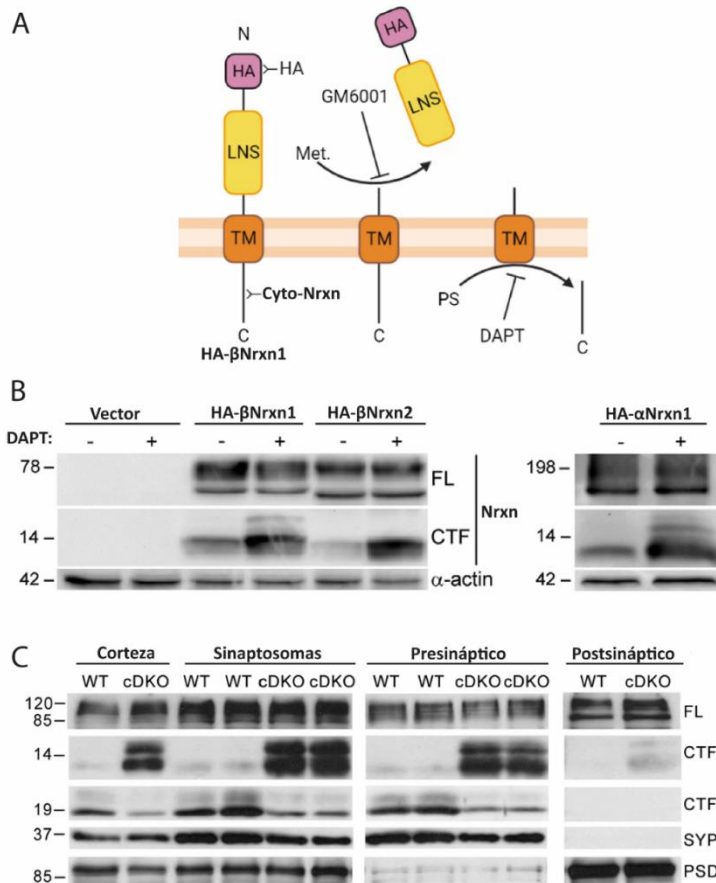


Figura 5. Acúmulo de NrnxCTF mediado por la falta de función de PS.

A.- Esquema representativo del procesamiento secuencial de Nrnxns. En rosa, el epítipo HA localizado en el extremo N-terminal siendo reconocido por el anticuerpo anti-HA. Se indica el anticuerpo anti-Cyto-Nrxn que reconoce a las Nrnxns en su extremo C-terminal. Esquema generado con Biorender.com **B.-** Análisis por *Western blot* empleando el anticuerpo anti-Cyto-Nrxn de células HEK 293 transfectadas con HA- β Nrxn1, HA- β Nrxn2 o HA- α Nrxn1. Se detecta el incremento de los NrnxCTF en presencia de DAPT **C.-** Purificaciones de sinaptosomas y fracciones pre y postinápticas de cerebros de animales PS cKO . Análisis por *Western blot* empleando anti-Cyto-Nrxn, anti-PS1, anti-Sinaptofisina y anti-PSD-95. Se observa un incremento de NrnxCTF en la fracción sináptica y presináptica. Sinaptofisina y PSD-95 son proteínas especialmente enriquecidas en las fracciones pre y postinápticas respectivamente. Adaptado de Saura et al., 2011.

Los resultados expuestos a continuación provienen de la publicación de nuestro grupo titulada “Proteolytic processing of Neurexins by Presenilins sustains synaptic vesicle release” en *Journal of Neuroscience* (Servián-Morilla et al., 2018).

En nuestro grupo se han desarrollado abordajes para analizar la fusión presináptica utilizando sondas fluorescentes que permiten analizar los niveles de Ca^{2+} y la liberación de neurotransmisor en terminales glutamatérgicos mediados por $Nrxns-Nlgn1$. En neuronas hipocampales en cultivo, demostramos que la adhesión transináptica $Nrxns-Nlgn1$ incrementa la entrada de Ca^{2+} y la probabilidad de liberación en terminales glutamatérgicos (Figura 6). La pérdida de función de PS, bien por inhibición farmacológica o bien por escisión génica de *PSEN1/2*, produce un acúmulo de $NrxnCTF$ en los terminales presinápticos reduciendo la probabilidad de liberación

Para confirmar que el acúmulo de $NrxnCTF$ es el sustrato de PS que media los defectos en la probabilidad de liberación, es necesario simular la falta de procesamiento de $NrxnCTF$ sin afectar la actividad general de PS. Se generaron varios mutantes con deleciones en el dominio yuxtamembrana extracelular de $\beta Nrxn1$ y se analizó la producción de los fragmentos $NrxnNTF$ y $NrxnCTF$ (Servián-Morilla et al., 2018). Se determinó que el sitio responsable de la liberación del ectodominio y la consiguiente generación de $NrxnCTF$ se encuentra entre los residuos 386 y 393.

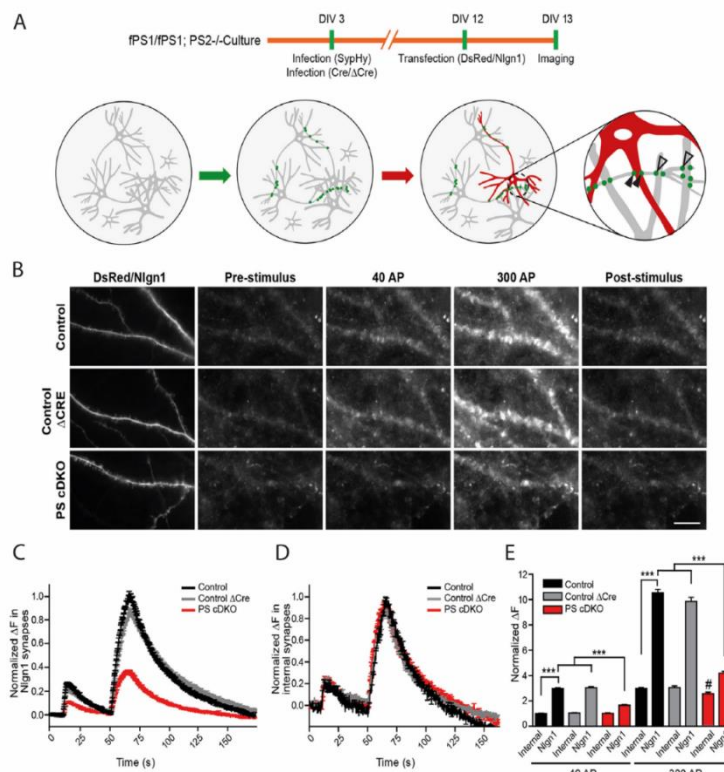


Figura 6. Inhibición de la liberación presináptica en sinapsis *Nlgn1* en neuronas provenientes de animales PScKO. A.- Esquema representativo del diseño experimental. Neuronas hipocampales *PS1^{f/f};PS2^{-/-}* se infectaron con lentivirus de expresión de Synaptophysin-pHluorin (SypHy) o junto a Cre o Δ Cre, seguido de la cotransfección de HA-*Nlgn1* y DsRed. En la misma población axonal se forman puntas sinápticas en dendritas que expresan *Nlgn1* (flechas negras) y que no la expresan (flechas blancas), las cuales sirven de control interno. **B.-** Imágenes de fluorescencia de SypHy en cultivos de neuronas hipocampales expresando SypHy (control) o SypHy junto a Cre o Δ Cre. La respuesta de SypHy se provocó con 40 y 300 potenciales de acción (APs). **C-E.-** Cinética y amplitudes de pico de la fluorescencia de SypHy normalizada en sinapsis internas e inducida por *Nlgn1*. Adaptado de Servián-Morilla, 2018.

Para evaluar la probabilidad de liberación y entrada de Ca^{2+} en presencia de NrnxCTF se generaron vectores de expresión de HA-NrnxCTF y HA-NrnxCTF Δ PDZ, mutante que carece de los últimos tres residuos C-terminales, esenciales para la interacción de Nrnx con las proteínas sinápticas de unión a dominio PDZ (Grootjans et al., 2000; Butz et al., 1998). Se observó que el acúmulo de NrnxCTF reduce la probabilidad de liberación y entrada de Ca^{2+} , y que el mutante que carece de los residuos PDZ presenta un menor efecto, indicando que el efecto inhibitor del NrnxCTF requiere de la integridad del dominio citoplásmico (Figura 7). HA-NrnxCTF interactúa con CASK mediante el dominio PDZ, sugiriendo que el acúmulo de NrnxCTF en terminales presinápticos puede asociarse y desplazar los sitios de interacción de las proteínas nativas, afectando así a su función.

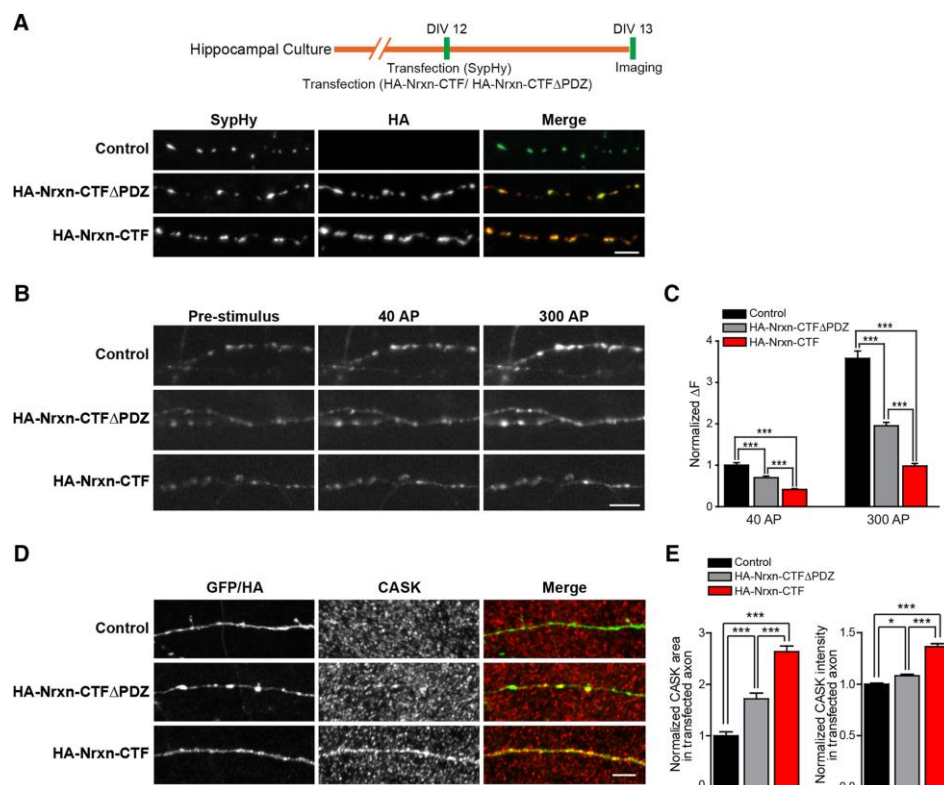


Figura 7. La expresión de NrnxCTF inhibe la liberación presináptica. **A.-** HA-NrnxCTF o HA-NrnxCTF Δ PDZ se co-transfectaron junto con SypHy en neuronas hipocámpales y se tiñeron empleando anti-HA. Los terminales presinápticos se detectaron con la fluorescencia de GFP. **B.-** Imágenes mostrando la respuesta SypHy a 40 y 300 PAs en axones que expresan HA-NrnxCTF o HA-NrnxCTF Δ PDZ. A la derecha, las amplitudes de pico de la fluorescencia de SypHy. Test empleado: Kruskal-Wallis con *post hoc* Dunn's test. *** $p < 0.001$. **D.-** Experimentos de inmunofluorescencia empleando anti-CASK y anti-HA. Se observa un acúmulo de CASK en axones que expresan HA-NrnxCTF. Test empleado: one-way ANOVA con *post hoc* Bonferroni. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Adaptado de Servián-Morilla et al., 2018

En conjunto, estos datos indican que NrnxCTF podría participar mediando los defectos en la entrada de Ca^{2+} y liberación de neurotransmisor originados por la falta de función de PS.

Tras las observaciones realizadas *in vitro*, el grupo decidió realizar una evaluación del efecto ocasionado por el acúmulo de NrnxCTF *in vivo*. Los resultados expuestos a continuación provienen de la publicación de nuestro grupo titulada “Selective expression of the neurexin substrate for presenilin in the adult forebrain causes deficits in associative memory and presynaptic plasticity” en *Experimental Neurology* (Sánchez-Hidalgo et al., 2022).

Se generaron ratones transgénicos que expresaban NrnxCTF etiquetado con HA en su extremo N-terminal bajo el control del promotor TRE. Se empleó el promotor CamKII α para controlar la expresión del transactivador de tetraciclina (tTA), requerido para la expresión del promotor TRE (Figura 8). De esta manera, los animales dobles transgénicos CamKII α -tTA;TRE-NrnxCTF (nombrados como NrnxCTF para simplificar) tendrán un patrón de expresión del transgén NrnxCTF similar al patrón de pérdida de función de PS observado en los animales PScKO pero manteniendo la actividad de PS endógena intacta.

En estudios previos, se ha descrito que el acúmulo de NrnxCTF producido en los animales PScKO por la pérdida de función de PS ocurre en los terminales presinápticos (Saura et al., 2011). Se analizaron preparaciones de sinaptosomas y se detectó HA-NrnxCTF en la fracción sináptica. Observamos una clara concentración en la fracción presináptica y no en la postsináptica de preparaciones provenientes de corteza e hipocampo (Figura 8). Nuestra aproximación está basada en el acúmulo de NrnxCTF sin afectar la función de PS/ γ -secretasa sobre otros sustratos. Se analizó el procesamiento de dos sustratos de PS en los animales transgénicos NrnxCTF y comparamos los resultados con animales PS1^{ff};PS2^{-/-};CamKII-CreERT2 (PScKO^{temp}), carentes de función de PS. Observamos un acúmulo esperado de APP y N-Cadherina-CTFs en los animales PScKO^{temp}, mientras que ninguno de estos sustratos de PS se vio incrementado en los animales NrnxCTF. Los niveles de PS tampoco se vieron alterados en estos animales. En los ratones PScKO^{temp} se observó un incremento del NrnxCTF al emplear un anticuerpo Cyto-Nrxn (Figura 8). El incremento observado en los animales transgénicos NrnxCTF fue de unas 4-5 veces el observado en los ratones PScKO. Estos datos parecen indicar que

tanto los niveles como la actividad proteolítica de PS/ γ -secretasa no se ven afectados en los animales NrnxCTF.

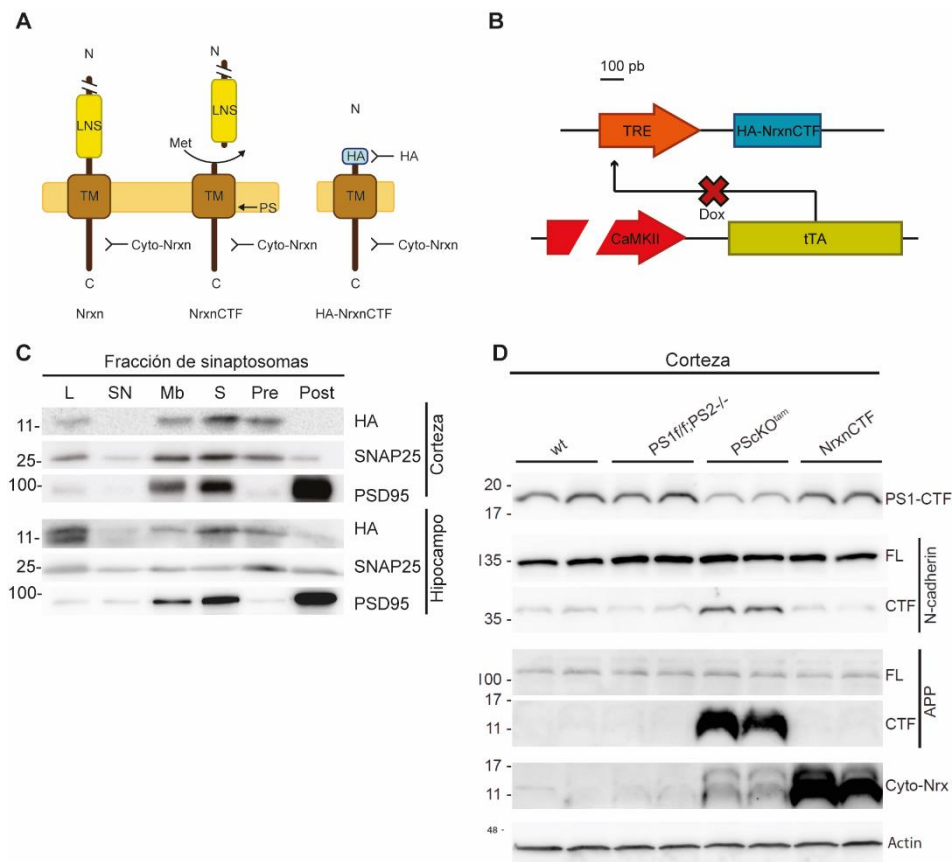


Figura 8. Generación del animal transgénico NrnxCTF y análisis de expresión del transgén HA-NrnxCTF. A.- Esquema representativo del procesamiento proteolítico de Nrnxns por metaloproteasas y PS. B.- Esquema representativo de la aproximación genética empleada para la expresión de HA-NrnxCTF en el cerebro. C.- Análisis de las fracciones de sinaptosomas con los anticuerpos anti-HA, anti-PSD-95 y anti-SNAP25. L: lisados; SN: sobrenadante; Mb: fracción de membrana; S: sinaptosomas; Pre: fracción presináptica; Post: fracción postsináptica. D.- Experimento de *Western blot* de lisados provenientes de corteza de animales control, PS1^{fl/fl};PS2^{-/-}, PSCKO^{temp} y NrnxCTF. Se analizaron los lisados con anticuerpos anti-PS1, anti-N-Cadherina, anti-APP y anti-Cyto-Nrxn. Este último reconoce la cola citoplásmica común de las Nrnx incluida la del transgén. Adaptado de Sánchez-Hidalgo et al., 2022.

Para el análisis fenotípico de los animales NrnxCTF, realizamos una extensa batería de pruebas de comportamiento que nos pudiese mostrar la presencia de posibles déficits. Los ratones NrnxCTF no mostraron defectos en la locomoción en el test del campo abierto. En la evaluación de estereotipias, se observó una reducción del 50% en los animales NrnxCTF respecto a animales controles en el tiempo de acalamiento. Para evaluar la interacción social, empleamos el test de las tres habitaciones. Los animales NrnxCTF mostraron una interacción preferente con el ratón en lugar de con el objeto inanimado, aunque el tiempo de interacción con el objeto se vio ligeramente incrementado sin alcanzar significancia estadística (Sánchez-Hidalgo et al., 2022).

El déficit en la memoria es uno de los marcadores clave en AD y en los modelos animales carentes de función de PS. Realizamos una evaluación de la memoria de los animales NrnxCTF en diferentes paradigmas. Por un lado, no se encontraron defectos en la prueba de reconocimiento de objeto nuevo ni en la memoria espacial (Sánchez-Hidalgo et al., 2022). Sin embargo, en los ratones NrnxCTF presentaron defectos en la memoria asociativa, reportados como una reducción en el tiempo de congelación asociado al tono en la prueba de condicionamiento al miedo (Sánchez-Hidalgo et al., 2022). Estos datos indican que la expresión del transgén NrnxCTF en el cerebro de animales adultos genera un descenso en las estereotipias, sutiles diferencias en la interacción social y defectos en la memoria asociativa.

La expresión presináptica de NrnxCTF en las neuronas corticales junto con el descenso observado en la memoria asociada al miedo en los animales NrnxCTF apuntan a que las sinapsis entre la corteza prefrontal y la amígdala basolateral (mPFC-BLA) puede ser una ruta potencial para descubrir los efectos sinápticos causados por el transgén NrnxCTF. En colaboración con el grupo del Dr José María Delgado (UPO), se implantaron electrodos de estimulación y de registro en el mPFC y la BLA, respectivamente, de animales controles y NrnxCTF para registrar potenciales de campo evocados (fEPSP). Tanto los animales controles como los ratones NrnxCTF presentaron curvas *input/output* con perfiles sigmoidales similares, sugiriendo que las propiedades funcionales de las sinapsis mPFC-BLA no se vieron afectadas en los ratones transgénicos. Sin embargo, en un análisis de plasticidad sináptica a corto plazo, se observó una facilitación más tardía en los animales NrnxCTF (Figura 9), indicando que la acumulación de NrnxCTF retrasa el rango óptimo para la facilitación sináptica en las sinapsis mPFC-BLA.

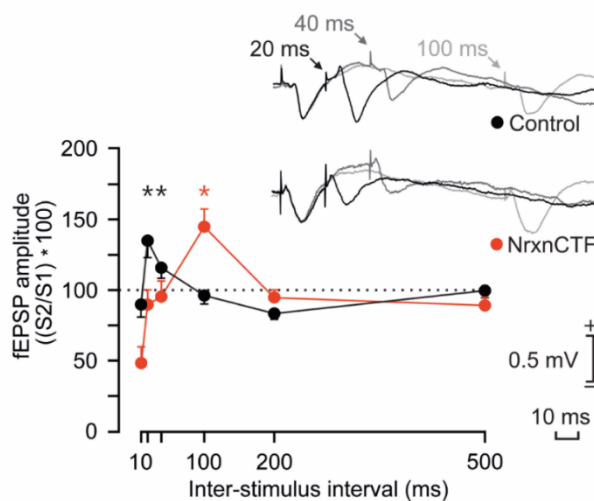


Figura 9. PPF evocada en las sinapsis mPFC-BLA en animales controles y NrnxCTF. Arriba, ilustraciones de ejemplos de registros de fEPSP de animales controles y NrnxCTF durante la PPF, representación de los 3 tiempos de intervalos de máxima facilitación (20, 40 y 100 ms). Abajo, resultados del test de PPF de animales controles y NrnxCTF. Los datos representan el ratio del segundo pulso entre el primer pulso de la amplitud del fEPSP multiplicado por 100, sobre los intervalos inter-estímulo crecientes (10, 20, 40, 100, 200 y 500). Cada punto representa el valor medio de 10 estímulos en 10 animales por grupo. * $p < 0.05$ en comparación con los valores a 500 ms, el valor más similar a los valores basales. Experimentos realizados en colaboración con José María Delgado. Adaptado de Sánchez-Hidalgo et al., 2022.

En conjunto, los datos obtenidos en el análisis fenotípico, conductual y electrofisiológico indican que la acumulación *in vivo* específica de NrnxCTF manteniendo la función de PS intacta provoca defectos en la memoria asociativa al miedo y en la plasticidad presináptica a corto plazo.

5 Antecedentes II: Papel de Neuroligina 1 en enfermedad de Alzheimer

5.1 Identificación de una mutación truncante en *NLGN1* en un caso de Alzheimer familiar y generación de un ratón *knockin*

Parte de los resultados expuestos a continuación fueron publicados por nuestro grupo en el artículo titulado “A truncating mutation in Alzheimer’s disease inactivates neuroligin-1 synaptic function” en *Neurobiology of Aging* (Tristán-Clavijo et al., 2015).

Mutaciones truncantes e inactivantes en *NLGN3* y *NLGN4X* se han asociado previamente a enfermedades del neurodesarrollo, particularmente a trastornos del espectro autista (TEA) e incapacidad intelectual (Jamain et al., 2003; Laumonnier et al., 2004). Nlgns y Nrnxns son sustratos de PS, un componente de la γ -secretasa donde frecuentemente se encuentran mutaciones asociadas a AD (Peixoto et al., 2012; Saura et al., 2011; Suzuki et al., 2012).

Con el objetivo de esclarecer el papel de Nlgn1 en AD, nuestro grupo describió una mutación de cambio de pauta de lectura en el gen *NLGN1* en una paciente de AD (Tristán-Clavijo et al., 2015). Tras una secuenciación de la región codificante de *NLGN1* en un grupo de 192 pacientes de AD, el grupo identificó una inserción de dos pares de bases en la posición 875 (c.875_876insTT; p.Thr271fs) en una de las pacientes. Se confirmó la ausencia de mutaciones en otros genes asociados a AD como *PSEN1*, *PSEN2* y *APP* o en otras *NLGNS* como *NLGN2*, *NLGN3* y *NLGN4*. La inserción de dos pares de bases afecta al residuo Thr271 de Nlgn1, localizado N-terminal del sitio de *splicing* alternativo B. La inserción predice un codón de *STOP* prematuro en la posición 284 para isoformas de Nlgn1 que carezcan del sitio B (Nlgn1 284X) o en la posición 293 para isoformas que si contengan dicho sitio (Nlgn1 293x).

Para analizar los efectos de la mutación en la función de Nlgn1, se generaron vectores de expresión de las proteínas mutantes y se observó que la mutación resultó en la expresión de proteínas truncadas de unos 30 KDa que se acumularon en el retículo endoplásmico (RE) sin alcanzar la superficie celular (Tristán-Clavijo et al., 2015). Además, se analizó la capacidad sinaptogénica de estas proteínas mutantes en cultivos neuronales observándose que no lograron la formación de sinapsis glutamatérgicas. En conjunto, estos datos indican que la mutación Nlgn1 Thr271fs asociada a AD resulta en la producción de una proteína truncada de 30 KDa que se acumula en el RE y que carece de capacidad sinaptogénica.

La mutación Nlgn1 Thr271fs produce una pérdida de expresión de Nlgn1, que podría ir acompañada de un efecto adicional mediado por el fragmento truncado de 30 KDa en el caso de expresarse *in vivo*. Con el objetivo de profundizar en las posibles consecuencias de la mutación Nlgn1 Thr271fs asociada a AD, en el grupo se generó un ratón KI empleando tecnología TALENS para incorporar la inserción de dos timinas en el gen de *Nlgn1* del ratón. Los detalles de la generación del nuevo modelo animal KI Nlgn1 Thr271fs se desarrollan en el apartado de resultados de esta Tesis Doctoral

5.2 Interacción de APP y Nlgn1

Existen numerosos estudios que apoyan que los péptidos A β causan déficits sinápticos y de memoria afectando el sistema Nrxns-Nlgn1. Se ha mostrado que mediante inyecciones agudas de A β en el hipocampo del ratón se genera una reducción parcial de Nlgn1 mediante mecanismos epigenéticos produciendo disfunción en las sinapsis glutamatérgicas y en memoria (Bie et al., 2014). Además de mediante mecanismos epigenéticos, el péptido A β podría impedir el correcto funcionamiento del sistema Nrxns-Nlgn1 mediante interacción directa proteína-proteína, como se ha observado más recientemente en neuronas en cultivo (Brito-Moreira et al., 2017; Naito et al., 2017). En conjunto, los datos clínicos y experimentales parecen apoyar que los péptidos A β puedan actuar mediante un descenso en los niveles o función de Nlgn1. Sin embargo, no se conoce si existen otros efectores de A β que pudieran jugar un papel más relevante que Nlgn1 *in vivo*. Basados en esta hipótesis, esperaríamos que los efectos deletéreos mediados por A β se vieran incrementados en modelos animales con una reducción

parcial de Nlgn1, pero que preservaran otros efectores potenciales de A β intactos. Por el contrario, otros estudios han demostrado que Nlgn1 actúa como un receptor sináptico de A β desencadenando su nucleación (Dinamarca et al., 2011, 2015). Esta hipótesis implicaría que en modelos animales con una reducción de los niveles de Nlgn1 podrían verse reducidos los efectos deletéreos del acúmulo de A β . Por otro lado, podría existir una interacción entre Nlgn1 y APP a través del propio APP o de otros de sus metabolitos. Para esclarecer la relación entre Nlgn1 y APP, es necesario la generación de nuevos modelos animales que expresen mutaciones en APP en un fondo genético con distintos niveles de Nlgn1.

II. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido profundizar en la posible relación del sistema de adhesión sináptico formado por Nrnxns y Nlgnns con AD mediante la generación de nuevos modelos celulares y animales. Los objetivos específicos de esta Tesis doctoral han sido:

1. Estudio de la interacción diferencial de isoformas de *splicing* de Nrnxn1 con Nlgn1 y -2 en la sinapsis.
2. Generación y validación de un modelo animal con control temporal de la pérdida de función de Presenilinas en el cerebro adulto.
3. Generación y validación de un modelo animal de sobreexpresión de NrnxnCTF en un contexto de pérdida de función de Presenilinas.
4. Caracterización fenotípica y conductual del modelo animal *knockin* Nlgn1 Thr271fs asociado a enfermedad de Alzheimer.
5. Generación de un modelo animal para el estudio de la interacción entre APP y Nlgn1.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1 Cultivos celulares

1.1 Células HEK 293T

1.1.1 Mantenimiento de la línea celular HEK 293T.

La línea celular HEK 293T deriva de células embrionarias de riñón humano. Esta línea celular es una modificación de la línea HEK 293, tras su transformación y expresión estable de los genes *E1A* y *E1B*, genes del antígeno T de la proteína SV40. Esta línea celular se ha empleado en esta tesis dada su facilidad para ser transfectada y sobreexpresar proteínas exógenas. El mantenimiento y cultivo de esta línea celular se ha realizado empleando frascos de cultivo (*JetBiofil*) en medio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM, *Gibco*) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS, *HyClone*, *Thermo Fisher Scientific*), glutamax 2mM (*Gibco*), penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (*Gibco*). Las células se mantuvieron en condiciones de 37 °C y 5% de CO₂ en un incubador.

1.1.2 Transfección de células HEK 293T

La transfección de esta línea celular se realizó empleando lipofectamina 2000 (*Invitrogen*). En placas estériles de 24 pocillos (*JetBiofil*) se cultivaron las células HEK 293T para conseguir un 60% de confluencia el día de la transfección. Se realizó una mezcla de 1.5 µl de lipofectamina 2000 más 100 µl de medio de cultivo *Optimem* (*Life Technologies*) por pocillo a transfectar. Por otro lado, se mezcló el plásmido a transfectar junto con 100 µl de *Optimem* por pocillo a transfectar. La mezcla de *Optimem* con lipofectamina 2.000 se añadió a la mezcla que contiene el plásmido a transfectar y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de lipofectamina 2.000 junto al plásmido a transfectar se añadió a los pocillos de células HEK 293T, a los que previamente se ha sustituido su medio de cultivo por 800 µl de *Optimem*. Las células se incubaron durante 2 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo se detuvo la transfección sustituyendo el medio por DMEM suplementado con un 10% de FBS, 2 mM glutamax (*Gibco*), 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (*Gibco*).

1.1.3 Producción de partículas lentivirales

Todos los protocolos que incluyen el manejo de lentivirus se realizaron en una campana de seguridad biológica clase 2 (*Telstar*). Los residuos generados se desinfectaron con lejía y se desecharon en un contenedor de residuos sanitarios infecciosos. El protocolo de generación de partículas lentivirales se realizó como se ha descrito previamente (Gascón et al., 2008). Se emplearon dos placas de cultivo de 15 cm de diámetro por cada preparación lentiviral sembradas el día previo con 15×10^6 células HEK 293T en un volumen de 25 ml de medio DMEM suplementado. A las 24 horas de la siembra, se descartaron 5 ml de medio y se transfectaron las células siguiendo el método de fosfato cálcico. Se emplearon 10 μg de pCAG-VSVg ΔC , 15 μg de $\Delta 8.9$ y 20 μg del vector lentiviral de transferencia. pCAG-VSVg ΔC codifica la proteína de la cápsida del virus de la estomatitis vesicular (VSV). $\Delta 8.9$ codifica la maquinaria de retrotranscripción e integración del material genético. El vector de transferencia codifica la secuencia de la proteína de interés a expresar bajo el control del promotor de sinapsina. Se mezcló el ADN de los diferentes plásmidos con 200 μl de CaCl_2 2.5 M y agua estéril hasta los 2 ml de volumen total. A continuación, gota a gota sobre un vórtex en agitación, se añadieron 2 ml de HBS 2x pH 7.05 (Na_2HPO_4 1.5 mM, NaCl 280 mM, HEPES 50 mM). Se realizó una mezcla por burbujeo durante 30 segundos y se añadió gota a gota a la placa de cultivo. Las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C con la mezcla de transfección. Tras este tiempo, se lavó la placa con tampón fosfato salino frío (PBS por sus siglas en inglés) y se añadieron 20 ml de medio fresco.

Pasadas 72 horas de expresión, se recogieron las partículas virales generadas. El medio se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos para eliminar restos celulares y se filtró con una membrana de SFCA de 0.45 μm de amplitud de poro (*Nalgene*). El medio se pasó a tubos *Ultra-Clear* de 38.5 ml (*Beckman Coulter*) y se centrifugó a 25000 rpm durante 90 minutos en la ultracentrífuga Optima L-100 XP empleando el rotor Sw32 Ti (*Beckman Coulter*). El precipitado con las partículas lentivirales se resuspendió en 100 μl de PBS frío y se dejó a 4°C durante 16 horas. Tras este tiempo, la preparación lentiviral se separó en alícuotas de trabajo y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

1.2 Cultivo primario de neuronas hipocampales de rata.

Los cultivos primarios de hipocampo se realizaron a partir de embriones de 18 días de gestación (E18) de ratas Wistar provenientes del Servicio de Producción y Experimentación animal del IBiS. La rata gestante se sacrificó mediante inhalación de CO₂. Se extrajeron los embriones mediante una cesárea y se colocaron en una placa de Petri estéril, se decapitaron y se extrajeron los cerebros que se colocaron en una placa de 6 cm de diámetro con DMEM (*Gibco*) suplementado con Glutamax 2 mM en hielo. Bajo la lupa, se diseccionaron las hemicortezas con unas pinzas de punta fina Dumont #5 (*Fine Scientific Tools*) y se distribuyeron en placas de 3.5 cm de diámetro con 2 ml de DMEM suplementado con Glutamax 2 mM. En la campana de flujo laminar se realizaron dos cortes con un escalpelo a cada hipocampo y se añadió 220 µl de tripsina al 2.5% (*Gibco*). Se dejó actuar la tripsina en el incubador durante 15 minutos. Tras la incubación, el tejido se disgregó mecánicamente en un tubo con 2 ml de medio DB1 (DMEM suplementado con suero fetal bovino 10%, D-(+)-glucosa [*Sigma*] 44.4 mM, Glutamax 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml [*Gibco*]) mediante pases por pipetas Pasteur de vidrio con la apertura de la punta reducida al 50% y posteriormente al 25%. Tras la disgregación mecánica, las células en suspensión se contaron en una cámara de Neubauer empleando azul de tripano (*Sigma*). Se sembraron 65.000 células por pocillo de una placa de 24 pocillos con cubreobjetos previamente tratados con poli-D-Lisina (0.5 mg/ml) disuelta en ácido bórico 75 mM pH 8.2 filtrado. Las neuronas se cultivaron durante 150 minutos en medio DB1 y posteriormente se sustituyó por medio Neurobasal completo (Neurobasal [*Gibco*], B27 [*Invitrogen*], Glutamax 2 mM, penicilina 100U/ml, estreptomina 100 µg/ml).

1.2.1 Transfección de cultivos neuronales

Las neuronas sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos se transfectaron con lipofectamina 2.000 (*Invitrogen*). Se realizó una mezcla de 0.5 µl de lipofectamina 2.000 más 50 µl de medio de cultivo Neurobasal (*Gibco*) por pocillo a transfectar. Por otro lado, se realizó una mezcla del plásmido a transfectar junto con 50 µl de Neurobasal por pocillo a transfectar. La mezcla de Neurobasal con lipofectamina 2.000 se añadió a la mezcla que contiene el plásmido a transfectar y se incubó a temperatura ambiente durante 20

minutos. A continuación, esta mezcla se añadió sobre las neuronas, a las que previamente se les había sustituido su medio de cultivo por 500 µl de medio Neurobasal suplementado con Glutamax 2 mM. El medio de cultivo en el que estaban las neuronas se reservó para después. Las células se incubaron durante 2 horas en el incubador a 37 °C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se detuvo la transfección sustituyendo el medio por 2/3 de medio recuperado más 1/3 de medio Neurobasal completo fresco.

1.2.2 Infección de cultivos neuronales

Los cultivos neuronales se infectaron a día 3 *in vitro*. Todo el manejo de partículas lentivirales se realizó en una campana de seguridad biológica clase 2 (*Telstar*). Se añadió un volumen de 5-10 µl de partículas lentivirales concentradas por pocillo. Se permitió la expresión viral durante 10 días previo a la realización del experimento.

1.2.3 Co-Cultivo de células HEK 293T con neuronas corticales

Los co-cultivos de células HEK 293T transfectadas se realizaron como se ha descrito anteriormente (Scheiffele et al., 2000). Las células HEK 293T se transfectaron como está descrito en el apartado 1.1.2 de Materiales y Métodos de esta tesis doctoral 24h antes de establecer el co-cultivo. A continuación, las células HEK 293T se tripsinizaron, se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en medio Neurobasal completo. Tras contar el número de células en una cámara de Neubauer empleando azul de tripano (*Sigma*), se sembraron 50.000 células HEK 293T totales por pocillo en una relación 4:1 entre células transfectadas con Nlgn3 y GFP respectivamente. Se sembraron sobre pocillos de cultivo de neuronas infectadas tras 12 días *in vitro*. El co-cultivo se analizó a las 24 horas de establecerse.

1.3 Inmunofluorescencia en células en cultivo

Las células crecidas sobre cubreobjetos se fijaron utilizando tampón fosfato 0.1 M con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar las células con PBS, se pasaron a solución de bloqueo (PBS con 5% suero de cabra y 0.05 Tritón X-100) durante 1 hora. A continuación, las células se incubaron con los anticuerpos primarios (ver apartado 7 de Materiales y Métodos) diluidos en la solución de bloqueo

durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos de duración y se incubaron las células con los anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo (ver apartado 7 de Materiales y Métodos). Se incubó con DAPI (1:5000) y se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos de duración. Para finalizar, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos utilizando como medio de montaje *Fluoromount-G (SouthernBiotech)*. Las muestras se conservaron a 4 °C protegidas de la luz.

Para la adquisición de imágenes se empleó el microscopio confocal *Stellaris (Leica)*. La adquisición de las imágenes se llevó a cabo bajo la supervisión de los técnicos de microscopía del centro, el Dr John Robert Pearson y el Dr Konstantin Levitskiy Epaneshnikov.

2 Generación de vectores de expresión y etiquetado con Flag de distintas isoformas de Neurexinas

2.1 Etiquetado con Flag en vectores de expresión pCAG

Para la generación de distintas isoformas de Nrns en vectores de expresión etiquetadas con Flag, se empleó la técnica de *Overlap extension-PCR* como se ha descrito previamente (Sambrook & Russel, 2006). Esta técnica se basa en realizar dos PCRs (de sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*) donde se añade parte de la secuencia que se quiere insertar sobre la secuencia molde y tienen parte de complementariedad entre ellas (Figura 10). La secuencia de la etiqueta Flag que se insertó fue: GATTACAAGGATGACGACGATAAG, DYKDDDDK (Tabla 1). Se empleó como secuencia molde el vector pCAG-HA- α Nrxn1 Δ 4 generado previamente en el grupo, insertando la etiqueta Flag en fase de lectura entre la asparagina 420 y la glicina 421, 28aa después del dominio transmembrana.

Nrxn1	N-Ter-...LYAMYKYRNRDEGSYHVDESRNYISNSAQSN-----GAVVKE...C-Ter
Nrxn1-Flag	N-Ter-...LYAMYKYRNRDEGSYHVDESRNYISNSAQSN DYKDDDDK GAVVKE...C-Ter

Tabla 1. Secuencia aminoacídica de Nrxn y Nrxn-Flag. Arriba, secuencia aminoacídica silvestre de parte del extremo C-ter común de Nrns. Abajo, secuencia aminoacídica de parte del extremo C-ter de Nrxn con la inserción del Flag (azul).

Empleando los oligonucleótidos descritos en la tabla 2, se realizaron 2 PCRs independientes. Los oligonucleótidos 2 y 3 contienen parte de la secuencia de la etiqueta Flag y 19-20 bases complementarias a la secuencia molde.

Oligonucleótido	Secuencia
1	5'-TATGCCATGTACAAGTACAGAAACC-3'
2	5'-CGTCATCCTTGTAAATCATTGGACTGTGCTGAGTTAC-3'
3	5'-GGATGACGACGATAAGGGGGCTGTGGTCAAGGAG-3'
4	5'-CCCGGGGTACCTCGAGT-3'

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos empleados para la *Overlap extensión-PCR*. En azul, secuencia complementaria entre los oligonucleótidos. En rojo, secuencia no complementaria.

Las reacciones se realizaron en el termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) empleando el siguiente programa: 3 minutos de desnaturalización inicial a 95 °C seguidos de 40 ciclos de desnaturalización (45 s a 94 °C), hibridación (45 s a 50 °C) y extensión (30 s a 72 °C), finalizando con un ciclo de 5 minutos a 72 °C para una extensión final. Tras las reacciones de PCR se purificó el ADN empleando un kit de purificación en columnas (*Illustra*) para eliminar los oligonucleótidos. A continuación, se juntaron los productos purificados de las PCR 1 y 2 (Figura 10) y se realizó una tercera PCR. Se llevaron a cabo 15 ciclos con una T_m de 60°C con todos los reactivos, pero sin oligonucleótidos en la reacción, y 25 ciclos más empleando los oligonucleótidos 1 y 4 (Tabla 2). Tras la reacción, se separó el producto final en un gel de agarosa (*Conda Lab*) al 2% y se comprobó por diferencia de tamaño con respecto a un amplicón control, la adición de las 24 pb correspondientes a la etiqueta Flag. Este producto se purificó empleando un kit de purificación en columnas (*Illustra*) y se clonó en el vector pGem-t easy (*Promega*). Tras comprobar por secuenciación que la secuencia de la etiqueta Flag estaba en fase de lectura con el resto de la secuencia de Nrnx, se clonó en el vector de expresión pCAG-HA- β Nrxn1 Δ 4 empleando las dianas de restricción BsrGI-KpnI siguiendo las recomendaciones del fabricante (*Takara*) obteniendo así el vector pCAG-HA- β Nrxn1 Δ 4-Flag.

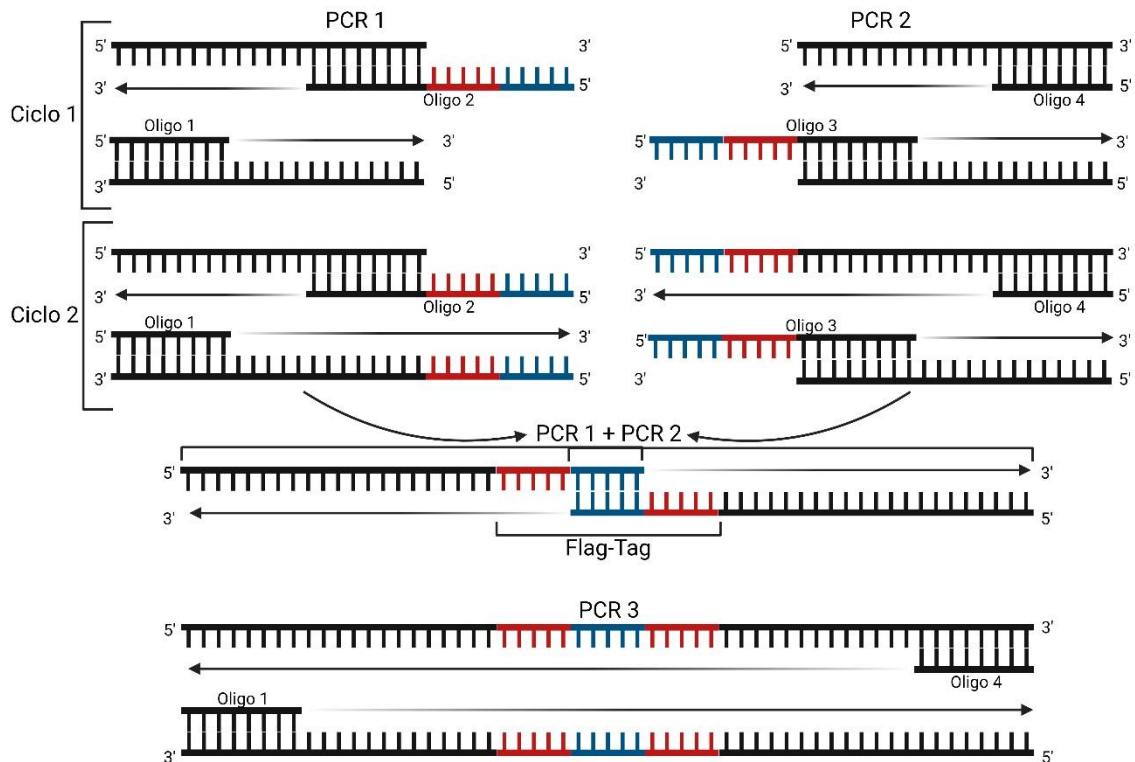


Figura 10 Overlap Extension-PCR. Esquema de la realización del protocolo. En azul, secuencia complementaria entre los dos oligonucleótidos. En rojo, secuencia no complementaria. Figura generada con biorender.com.

Para la obtención de pCAG-HA- β Nrxn1SP4-Flag se empleó el vector pCAG-VSV- β Nrxn1SP4 previamente generado en el grupo. Se clonó el fragmento que contiene el SP4 sobre el vector pCAG-HA- β Nrxn1 Δ 4-Flag empleando las dianas de restricción BstEII-BsrGI siguiendo las recomendaciones del fabricante (*Takara*).

La generación de pCAG-HA- α Nrxn1 Δ 4-Flag se llevó a cabo clonando el fragmento BsrGI-SmaI proveniente del vector pCAG-HA- β Nrxn1 Δ 4 sobre el vector pCAG-HA- α Nrxn1 Δ 4 siguiendo las indicaciones del fabricante (*Takara*).

2.2 Generación de isoformas de Nrxn en vectores lentivirales de transferencia

Para la obtención del vector Syn-HA- β Nrxn1 Δ 4-Flag se realizó una PCR empleando la pareja de oligonucleótidos incluidas en la tabla 3 utilizando de ADN molde el vector pCAG-HA- β Nrxn1 Δ 4. Esta PCR añadió la diana de restricción EcoRI en uno de los extremos, no presente en el vector pCAG. Tras clonar el amplicón en el vector *pGemT easy* (*Promega*) según las recomendaciones del fabricante, se clonó el fragmento BsrGI-EcoRI que contiene la etiqueta Flag sobre el vector Syn-HA- β Nrxn1 Δ 4.

Amplicón	Oligonucleótido <i>sense</i>	Oligonucleótido <i>anti-sense</i>
β Nrxn1-EcoRI	5'-ACCTCAATCATGGAGACC-3'	5'-GAATTCAGGAGTGAATTGAGCTCC-3'

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la obtención de Syn-HA- β Nrxn1 Δ 4-Flag. En rojo, diana de restricción EcoRI.

A continuación, se clonó el fragmento BstEII-BsrgI del vector pCAG-HA- β Nrxn1SP4-Flag en el vector Syn-HA- β Nrxn1 Δ 4-Flag, para así obtener Syn-HA- β Nrxn1SP4-Flag.

Para la obtención de Syn-HA- α Nrxn1 Δ 4-Flag, se realizó un clonaje en dos partes. Primero se clonó el fragmento NsiI-BstEII proveniente de pCAG-HA- α Nrxn1 Δ 4 sobre el vector Syn-HA- β Nrxn1 Δ 4-Flag. A continuación, sobre este vector intermedio se clonó el fragmento BstEII-BsrgI proveniente del vector pCAG-HA- α Nrxn1 Δ 4, obteniendo así el vector final Syn-HA- α Nrxn1 Δ 4-Flag.

Para obtener el vector Syn-HA- α Nrxn1SP4-Flag se clonó el fragmento BstEII-BsrgI, conteniendo el SP4, proveniente del vector pCAG-HA- β Nrxn1SP4-Flag sobre la construcción Syn-HA- α Nrxn1 Δ 4-Flag.

3 Aspectos generales derivados del empleo de modelos animales

3.1 Normativa del uso de animales de experimentación

Todos los procedimientos con animales de experimentación realizados en esta Tesis Doctoral siguieron la normativa marcada por el Real Decreto 53/2013 donde se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales empleados en experimentación y fueron llevados a cabo por personal cualificado. Los experimentos desarrollados se aprobaron por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla.

La estabulación y mantenimiento de los animales de experimentación se llevó a cabo en Centros de Experimentación Animal autorizados por la Conserjería de Agricultura, pesca y Medio Ambiente (ES410910008015, ES410400008002, ES410910008009). Los animales se mantuvieron a temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, acceso ilimitado a comida y agua y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas de duración, de acuerdo con las directrices europeas (Directiva 2010/63EU).

Los animales dedicados a la extracción de muestras de tejido se sacrificaron mediante dislocación cervical o mediante dosis letal de anestesia Tiobarbital (*Braun*).

3.2 Población experimental del modelo animal PScKO^{temp} y PScKO;NrxnCTF

El modelo animal PScKO^{temp} proviene del cruce de animales PS1^{ff}; PS2^{-/-} generados originalmente en Huakui Yu et al., 2001 y Steiner et al., 1999 y cedidos a nuestro grupo por el laboratorio del Dr Carlos Saura y la Dra J. Shen, con animales CaMKII-CreERT2 cedidos a nuestro grupo por el laboratorio del Dr Rafael Fernández Chacón. Para la obtención de los animales PScKO;NrxnCTF, se cruzaron animales PScKO (PS1^{ff}; PS2^{-/-}; CaMKII-CreERT2) con animales CaMKII-HA-NrxnCTF previamente generados en el grupo. La identificación de los animales se realizó mediante un código de marcaje en oreja.

3.3 Población experimental del modelo animal Nlgn1 Thr271fs.

La línea de ratones Nlgn1 Thr271fs procede del cruce de animales *wild type* de la cepa C57BL6/J y animales HTZ Nlgn1 Thr271fs de la cepa FVB. Para la obtención de animales homocigotos Nlgn1 Thr271fs (HMZ) se cruzaron animales HTZ Nlgn1 Thr271fs entre ellos. Como control se emplearon animales *wild type*. La identificación de los animales se realizó mediante un código de marcaje en oreja.

3.4 Población experimental del modelo animal hAPP_{751SL}

El modelo animal hAPP_{751SL} fue cedido a nuestro grupo por el laboratorio del Dr. Javier Vitorica (Universidad de Sevilla/IBiS). La identificación de los animales se realizó mediante un código de marcaje en oreja.

3.5 Extracción de DNA genómico y genotipado de ratones.

El genotipado de los animales se llevó a cabo mediante amplificación por PCR. Biopsias de entre 1-2mm provenientes del extremo de la cola, facilitadas por el servicio de Producción y Experimentación Animal (IBiS), se incubaron durante 45 minutos a 95 °C

con 75 µl de solución A (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA pH 12). A continuación, las muestras se neutralizaron con 75 µl de solución B (40 mM Tris-HCl, pH 5.5).

Para la reacción de PCR se emplearon 40 ng de ADN, la polimerasa *GoTaq Flexi*, nucleótidos, magnesio, tampón para la polimerasa sin tampón de carga (*Promega*) y los oligonucleótidos especificados en la tabla 4. La reacción se realizó en el termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems)* empleando el siguiente programa: 3 minutos de desnaturalización inicial a 95°C seguidos de 40 ciclos de desnaturalización (45 s a 94 °C), hibridación (45 s, temperatura especificada en la tabla 4 para cada amplicón) y extensión (45 s a 72 °C), finalizando con un ciclo de 7 minutos a 72 °C para una extensión final. Únicamente para la genotipación de la línea de animales *Nlgn1 Thr271fs*, tras la PCR, se realizó una reacción de restricción empleando la enzima *HpaI (New England Biolabs)* empleando el tampón *CutSmart (New England Biolabs)*. La reacción de restricción se llevó a cabo durante 2 horas a 37 °C. El producto resultante se migró en un gel de 0.8% agarosa (*Conda Lab*) disuelta en TAE (40 mM Tris pH 7.6, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) y teñido con bromuro de etidio 0.00002% empleando el equipo de electroforesis *Mupid-one (Takara)*.

Amplicón	Oligonucleótido <i>sense</i>	Oligonucleótido <i>anti-sense</i>	T ^º Hibridación
<i>Nlgn1</i> ex6	5'-TCCAGGCTTCTTGAGCACAG-3'	5'-CATCTTACCCAGCTCCATGG-3'	64 °C
<i>Psen1</i>	5'-GGTTTCCCTCCATCTTGTTG-3'	5'-TGCCCCCTCTCCATTTTCTC-3' 5'-TGCCCCCTCTCCATTTTCTC-3'	60 °C
<i>Psen2</i>	5'-CATCTACACGCCCTTCACGG-3'	5'-AAGGGCCAGCTCATTCTCC-3' 5'-AAGGGCCAGCTCATTCTCC-3'	65 °C
<i>CreERT2</i>	5'-GGTCTCCGTTTGCACTCAGGA-3'	5'-CTGCATGCACGGGACAGCTCT-3' 5'-GCTTGACAGGTACAGGAGGTAGT-3'	63 °C
<i>NrxnCTF</i>	5'-GTACAAGTACAGAAACCGGG-3'	5'-CACACCACAGAAGTAAGGTTCC-3'	58 °C
Actina	5'-GCTGGAACGATCACATACCG-3'	5'-AGCTCCTGATGATCCAATGG-3'	58 °C
<i>hAPP_{751SL}</i>	5'-GGCTGAGGAACCTACGAAGA-3'	5'-CAAAGTACCAGCGGGAGATCA-3'	60 °C

Tabla 4. Secuencia de las parejas de oligonucleótidos empleadas para el genotipado de los ratones

4 Técnicas bioquímicas para el análisis de proteínas

4.1 Obtención de tejido para la realización de lisados

Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y posteriormente se decapitaron. Tras separar la calota craneal, el cerebro se extrajo empleando una espátula de microcirugía. El cerebro completo se pasó a una placa de 6 cm de diámetro (JetBiofil) con PBS. Bajo la lupa y manteniendo la placa sobre hielo para evitar la degradación del tejido, se localizaron y diseccionaron las estructuras cerebrales de interés empleando unas pinzas de punta fina Dumont #5 (*Fine Scientific Tools*). El tejido diseccionado se congeló en nitrógeno líquido en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml (*Eppendorf*).

4.2 Extracción de proteínas a partir de tejido.

La extracción de proteínas se realizó empleando tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete Mini EDTA-free tablets*, Roche). El volumen de tampón de lisis utilizado en la extracción dependió de la estructura cerebral a lisar. Empleando un pistilo de plástico con forma cónica acoplado a un homogenizador portátil a motor (*VWR*), se realizó una primera disgregación mecánica del tejido. A continuación, se realizó una segunda disgregación mecánica mediante 10 pases por una jeringa de 27G (BD). Tras 10 minutos en hielo, se realizó una centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga de mesa para descartar los restos insolubles y se apartó el sobrenadante conteniendo la parte de proteínas solubles. Todo el proceso se realiza en hielo. Los lisados se separaron en alícuotas de trabajo y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

4.3 Extracción de proteínas a partir de cultivos celulares.

Partiendo de las células sembradas en pocillos se lavó con PBS frío. Tras eliminar el PBS se añadieron 100 µl a cada pocillo de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas. Tras una incubación durante 10 minutos sobre hielo, las

muestras se disgregaron mecánicamente mediante 10 pases por una jeringa de 27 G. Tras 10 minutos en hielo, se realizó una centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga de mesa para descartar los restos insolubles y se apartó el sobrenadante conteniendo la parte de proteínas solubles. Todo el proceso se realiza en hielo. Los lisados se separaron en alícuotas de trabajo y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

4.4 Electroforesis en geles SDS-poliacrilamida y transferencia de proteínas.

Se cuantificó la cantidad de proteínas totales presentes en las muestras empleando el kit BCA (*Thermo Fisher Scientific*) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras se diluyeron para obtener la cantidad total de proteínas a cargar en tampón de carga (Tris-HCl 180 mM pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.005% azul de bromofenol, 4% β -mercaptoetanol). Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 95 °C para favorecer la desnaturalización de las proteínas.

Los geles de SDS-Bis-acrilamida empleados para la separación de las proteínas se prepararon empleando cristales un grosor de 1.5 mm (*BioRad*) y peines de 10 o 15 carriles (*BioRad*). Se utilizó una mezcla de acrilamida:bis-acrilamida 37.5:1 (*BioRad*). Los geles de separación constan de dos fases, una superior al 4% de acrilamida (solución apiladora) y una inferior al 8-13.5% de acrilamida en función del peso molecular de la proteína a analizar (solución separadora). La electroforesis se realizó empleando el sistema mini-Protean (*BioRad*) con tampón Tris-Glicina-SDS (tris 25 mM, glicina 192 mM, 0.1% SDS).

Las muestras en tampón de carga y el marcador de peso molecular pre-teñido (*bioBlu, gTPbio*) se cargaron en los pocillos del gel y se separaron aplicando corriente constante de 100 V. Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF de 0.45 μ m (*Millipore*) previamente activada sumergiéndola en metanol 100%. Esta transferencia se realizó en el sistema de transferencia húmeda mini-Trans-Blot (*BioRad*) en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol) aplicando una corriente de 300 mA constantes durante 90 minutos.

4.5 Inmunodetección de proteínas

Para bloquear las uniones inespecíficas, se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en 5% leche desnatada deshidratada disuelta en tampón Tris Salino-Tween (TBS-T) (NaCl 137 mM, Tris 20 mM, 1% Tween pH 7.4). A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente diluido en 2.5% leche desnatada deshidratada disuelta en TBS-T (ver apartado 7 de Materiales y Métodos). La incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente o bien durante 16 horas a 4 °C en agitación continua. Tras la realización de 3 lavados en agitación de 10 minutos de duración con TBS-T, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa HRP (*Jackson ImmunoResearch*) diluido 1:5000 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente (ver apartado 7 de Materiales y Métodos para la información de los anticuerpos secundarios). A continuación, se realizaron 3 lavados en agitación de 10 minutos de duración con TBS-T.

4.6 Revelado, toma de imágenes y cuantificación.

La membrana se incubó con los reactivos reveladores *Clarity* o *Clarity Max* (BioRad) durante 1-2 minutos y se detectó la quimioluminiscencia emitida empleando el transiluminador *Chemidoc Touch* (BioRad). Se tomaron imágenes digitales acumuladas cada 2-5 segundos hasta la saturación de la señal. Para la cuantificación de las imágenes se empleó el *software* Quantity-One (BioRad). Se seleccionaron 4 imágenes no saturadas con tiempos de exposición en incremento y se trazaron rectángulos sobre las bandas a cuantificar, además de un área igual trazada sobre una región de señal inespecífica. Se cuantificó la suma de la intensidad de los píxeles dentro de cada área restándole el fondo de señal inespecífica. Este proceso se repitió en las distintas imágenes seleccionadas, clonando las áreas a cuantificar. Para la cuantificación se tomó el valor promedio de cada banda en las imágenes seleccionadas.

5 Técnicas para el análisis histológico

5.1 Análisis de proteínas en tejido cerebral

5.1.1 Perfusión transcardíaca, fijación y corte del tejido

Los animales se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal con Tiobarbital (*Braun*) a una dosis letal. Tras comprobar un profundo nivel de sedación por la ausencia de reflejos al dolor en patas y cola, se realizó una perfusión transcardíaca con PBS frío empleando una bomba de perfusión a velocidad constante durante 5 minutos. A continuación, se extrajo el cerebro y se post-fijó sumergiéndolo en una solución de paraformaldehído (*Sigma*) al 4% en PBS, pH 7.4 durante 16 horas a 4°C.

Una vez fijado, el cerebro se deshidrató mediante una inmersión en sacarosa al 30% en PBS durante 72 horas a 4°C. Se incluyó en OCT líquido (*Tissue-Tek, VWR*) y se congeló en nieve carbónica. Los bloques se preservaron a -80 °C hasta su procesamiento. Se realizaron cortes coronales de 20 µm de grosor empleando un criostato (*Leica*) y se preservaron en placas de 24 pocillos con 5-10 cortes por pocillo sumergidos en solución crioprotectora (30% etilenglicol, 30% glicerol en PBS) a -20 °C hasta su uso.

5.1.2 Inmunohistoquímica

Las inmunohistoquímicas de esta tesis doctoral se realizaron siguiendo el método *free-floating*, empleando 5 cortes de cerebro por pocillo en placas de 12 o 24 pocillos.

Tras tres lavados de 5 minutos de duración con PBS para eliminar los restos de solución crioprotectora, se realizó un desenmascaramiento de antígeno empleando una solución de citrato sódico 10 mM, pH 6 a punto de ebullición, tres tratamientos de 10 minutos de duración. Tras 3 lavados con PBS de 5 minutos de duración, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con una solución de 0.006% H₂O₂, en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave. Tras volver a realizar 3 lavados con PBS de 5 minutos de duración, se realizó la permeabilización y bloqueo del tejido en solución de bloqueo (0.3% tritón X-100, 5% suero de cabra en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Se prepararon los anticuerpos primarios (ver apartado 7 de Materiales y Métodos) en solución de bloqueo (0.1% Tritón X-100, 5%

suero de cabra en PBS) y se incubaron los cortes a 4 °C durante 16 horas. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS en agitación suave y los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (ver apartado 7 de Materiales y Métodos) diluido en PBS 0.1% Tritón-X100 durante dos horas a temperatura ambiente en agitación suave. Tras 3 lavados de 10 minutos con PBS, los cortes se incubaron con avidina/biotina-HRP durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave empleando el kit de tinción peroxidasa ABC (*Vectastain*). Tras 2 lavados de 10 minutos con PBS, se incubó con la solución reveladora conteniendo el sustrato diaminobenzidina (DAB) y potenciador de color de níquel (1% DAB, 0.05% sulfato amónico de níquel, 0.033% H₂O₂, en PBS). Se estableció un tiempo de revelado para cada anticuerpo en base a la relación fondo/señal específica empleando cortes que no fueron incubados con anticuerpo primario como control negativo. Los cortes una vez revelados se montaron en portaobjetos *superfrost* (*Menzer-Glazer*) y, una vez secos, se deshidrataron siguiendo una cadena de etanol de concentración creciente (50% - 100%) y xilol. Se montó un cubreobjetos empleando medio de montaje DPX (*Merck*).

5.1.3 Toma de imágenes y cuantificación

La adquisición de imágenes de las inmunohistoquímicas de tejido cerebral se realizó empleando el microscopio *Thunder* (*Leica*). Utilizando la pletina automatizada del microscopio, se realizó un escaneo completo de 4 portaobjetos utilizando el objetivo 5x para localizar los cortes. Una vez localizados, se tomaron las imágenes de cada corte completo empleando el objetivo 20x y las condiciones de iluminación óptimas para maximizar el contraste entre fondo y señal específica para cada marcador. Se obtuvieron entre 15 y 20 imágenes por corte que se combinaron en una super-imagen compuesta utilizando el *software* de *Leica*. Las imágenes se enfocaron de manera automática estableciendo 4-6 puntos de foco por corte.

La cuantificación de los diferentes marcadores se realizó en el programa libre *ImageJ* (*NIH*).

Para el grosor de corteza se midió la distancia en micras (μm) entre la capa II/III y el cuerpo calloso. Se seleccionó una región con un grosor constante situado sobre el hipocampo. La cuantificación de densidad de células NeuN positivas se realizó mediante

un conteo manual sobre un área determinada en la misma región donde se cuantificó el grosor de corteza.

La cuantificación de los marcadores GFAP e Iba1 se realizó estableciendo un umbral para transformar las imágenes en binario. El umbral se estableció para que la región positiva coincidiera con la señal específica y se eliminara el fondo de cada imagen. Se dibujó un área determinada y se cuantificó el porcentaje de área ocupada por los marcadores. Para el marcador Iba1 también se realizó un conteo manual de las células Iba1⁺ dentro de la misma área.

En la cuantificación de las imágenes colaboraron Luna López Coletto, estudiante de máster, y Samuel López Rodríguez, antiguo miembro del laboratorio.

5.2 Tinción de Golgi-Cox

5.2.1 Procesamiento de las muestras

La tinción mediante el método Golgi-Cox se realizó como ha sido descrita previamente (Glaser et al., 1981; Marco et al., 2013). Todos los pasos de incubación se realizaron en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. La solución Golgi-Cox (1% K₂Cr₂O₇, 1% HgCl₂, 0.8% K₂CrO₄) se preparó 5 días antes de su uso para descartar los precipitados iniciales. Los animales se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de Tiobarbital (*Braun*) a dosis letal. Tras comprobar una profunda sedación, los animales se decapitaron y se extrajo el cerebro completo. El cerebro, separado en dos hemisferios, se sumergió en la solución Golgi-Cox durante 48 horas, tras las cuales la solución se renovó. Tras una incubación de 3 semanas, se realizaron 3 lavados de 2 minutos de duración con agua destilada y 1 incubación con 90% etanol durante 30 minutos. A continuación, los cerebros se sumergieron en 70% etanol y, empleando un vibratomo (*Leica*), se seccionaron obteniendo cortes coronales de 200 µm de grosor. Los cortes se lavaron con agua destilada y se incubaron con una solución de NH₃ al 15% durante 1 hora para reducir la solución Golgi-Cox. Tras un lavado con agua destilada, los cortes se incubaron con 1% Na₂S₂O₃ durante 7 minutos para la fijación de la tinción. Las secciones cerebrales se montaron sobre portaobjetos *superfrost* (*Menzer-Glazer*) y se deshidrataron siguiendo una cadena de etanol de concentración creciente (50% - 100%) y xilol. Se montó un cubreobjetos empleando medio de montaje DPX (*Merck*).

5.2.2 Toma de imágenes y cuantificación de la densidad de espinas dendríticas

Para la toma de imágenes se empleó el microscopio de campo claro BX-61 (*Olympus*). Tras localizar la región CA1 del hipocampo empleando el objetivo 5x, se localizó una neurona relativamente aislada utilizando el objetivo 20x. Con el objetivo 100x se adquirieron imágenes en varios planos en el eje Z con una separación entre ellos de 0.5 μm (entre 20-30 imágenes por neurona). Se adquirió el árbol dendrítico completo teniendo en cuenta que las dendritas secundarias quedaran enfocadas.

Para la cuantificación de la densidad de espinas dendríticas se empleó el programa libre *ImageJ* (*NIH*). Se midió la distancia en micras (μm) de los segmentos dendríticos secundarios con una longitud mínima de 10 μm como criterio de inclusión. A continuación, se realizó un contaje manual de las espinas dendríticas localizadas sobre este segmento dendrítico. A partir de estos datos se calculó la densidad de espinas dendríticas para cada segmento dendrítico y el promedio de la densidad de espinas dendríticas para cada neurona.

6 Experimentos de comportamiento en ratones

6.1 Condiciones generales para la realización de comportamiento en ratones

Los animales se estabularon en la zona donde se les realizaría el comportamiento 5 días previos al comienzo de los experimentos para favorecer el aclimatamiento de los mismos a las salas. Para disminuir el estrés derivado del propio manejo de los animales, el experimentador que realizó los test manipuló los ratones en la sala donde se realizará el test de comportamiento durante 2 días en sesiones de 5 minutos por animal los días previos a la realización del test. Tanto durante la realización de los test como durante el manejo inicial de los animales, se evitó el uso de perfume y que se generaran ruidos que pudieran alterar el comportamiento de los animales y, por tanto, los resultados obtenidos. Los animales se trasladaron a la sala donde se realizó el test con un mínimo de 20 minutos antes del inicio de las pruebas de comportamiento. Estas pruebas se realizaron en la fase de luz y en la franja horaria entre las 09:00 y las 17:00. Entre los distintos animales evaluados en el mismo día, los distintos aparatos se limpiaron con un detergente inodoro diluido, *Derquim* (*PanReac*). Durante la realización del test y la

extracción de los datos se desconocía el genotipo de los animales. A la realización de algunos de los experimentos colaboraron Ana Carmen Sánchez Hidalgo y Celia Martín Cuevas, antiguos miembros del grupo de investigación.

6.2 Análisis SHIRPA

Para una evaluación inicial del estado general de los animales previa a la realización de los experimentos de comportamiento se realizó la batería de test primarios SHIRPA (*SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital phenotype assessment*) (Rogers et al., 1997) recogidos en la tabla 5.

Reflejo analizado	Realización	Observación
Posición corporal y actividades espontaneas	Observación del animal en la batea	Temblores, espasmos o saltos
Reflejo de enderezamiento	Colocación del animal en decúbito supino	Capacidad para corregir la postura y apoyarse sobre las patas
Reflejo postural	Suspensión del animal sujeto por la cola y colocación sobre la esquina de la batea	Capacidad de tratar de girarse sobre sí mismo
Reflejos faciales	Estimulación táctil suave sobre el pabellón auditivo, vibrisas y párpados	Capacidad de retirada del pabellón auditivo y vibrisas o cierre del párpado
Fuerza en extremidades	Colocación en decúbito supino sobre una reja	Capacidad de mantenerse agarrado durante un minuto
Visión	Suspendido de la cola se aproxima al animal a una superficie	Extensión de las extremidades delanteras hacia la superficie
Reflejo auditivo	Se genera un ruido seco y fuerte	Sobresalto producido como reacción al ruido

Tabla 5. Pruebas empleadas para la evaluación de la batería SHIRPA.

6.3 Evaluación locomotora

La prueba de campo abierto se realizó en una arena cuadrada de metacrilato gris de 45 x 45 cm con paredes opacas (*Harvar Apparatus*). Se permitió al ratón la libre exploración de la arena durante 15 minutos, tiempo durante el cual sus movimientos se grabaron desde un plano cenital con una cámara (*PanLab*). Empleando el programa *Smart (PanLab)* se detectó automáticamente el animal y sus movimientos, calculando así la distancia total recorrida y el número de entradas al centro de la arena delimitado como un área de 25 x 25 cm (Figura 11).

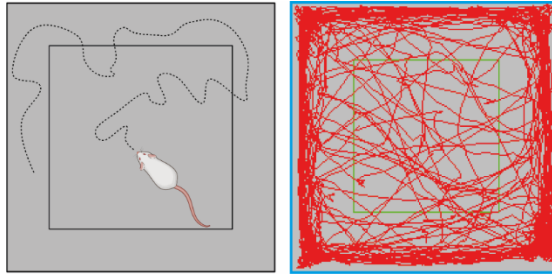


Figura 11. Test de campo abierto. A la izquierda, una representación ilustrada de cómo se graba desde el plano cenital el test. A la derecha, los datos de trayectoria obtenidos con el programa *Smart*. En rojo, la trayectoria del animal; en azul, el límite de la periferia y en verde el límite del centro de la arena. Ilustración realizada con Biorrender.com.

6.4 Evaluación de estereotipias

Se colocó al ratón en el centro de una batea limpia durante 10 minutos para su habituación. Durante los siguientes 10 minutos se grabó el comportamiento del animal desde una vista frontal (Figura 12). Se cuantificó manualmente el tiempo de acicalamiento realizado durante los 10 minutos. Un evento de acicalamiento se consideró como cualquier secuencia de movimientos realizada con las extremidades superiores, inferiores o boca para limpiar su propio cuerpo y pelaje.

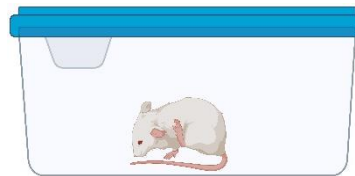


Figura 12. Test de acicalamiento. Representación ilustrada del test realizada con Biorender.com.

6.5 Evaluación de preferencia social

La prueba para evaluar la preferencia social se realizó en una arena de metacrilato transparente de 60 x 42 cm de superficie con 3 estancias (una central y dos laterales de 20 x 42 cm cada una) conectadas entre sí mediante unas compuertas deslizantes (*Harvard Apparatus*) (Figura 13). La prueba se realizó como ha sido descrita previamente (Silverman et al., 2010) y consta de 3 etapas de 10 minutos de duración cada una:

- I) Pre-habituación. El animal se colocó en la estancia central con las compuertas que comunican con las estancias laterales cerradas.
- II) Habituación. Se abrieron las compuertas laterales y se dejó explorar las tres estancias libremente. En las estancias laterales se colocó una jaula cilíndrica vacía (8 cm de diámetro).

- III) Preferencia social. En las estancias laterales se colocaron jaulas cilíndricas conteniendo o un objeto inanimado (Cubo de plástico) o un ratón del mismo sexo, edad y fondo genético que el ratón a evaluar. El animal a evaluar se colocó en la estancia central y se le permitió explorar libremente las tres estancias (figura 13).

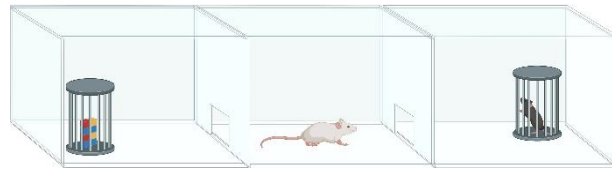


Figura 13. Test de preferencia social. Representación ilustrada del test realizada con Biorrender.com.

Las tres fases se grabaron en vídeo desde una vista cenital empleando una cámara (*PanLab*). Se cuantificó manualmente la interacción en la fase III con el objeto inanimado o con el ratón. Se consideró interacción cualquier evento de contacto directo del hocico con el cilindro.

6.6 Evaluación de la memoria

6.6.1 Reconocimiento de objeto nuevo

La prueba de reconocimiento de objeto se realizó como se ha descrito anteriormente (Leger et al., 2013; Vogel-Ciernia et al., 2014). Consta de 3 fases (figura 14):

- I) Habitación al contexto. Se colocó al animal en la arena del test de campo abierto y se dejó explorar libremente durante 15 minutos.
- II) Retención. 24 horas después de la habituación al contexto, se colocaron en las esquinas superior derecha e inferior izquierda dos objetos idénticos adheridos a la base y separados entre ellos y de las paredes a la misma distancia. Se dejó explorar al animal la arena durante 10 minutos.
- III) Evaluación de la memoria. Pasados 5, 15, 30 o 60 minutos, uno de los dos objetos idénticos se sustituyó por un objeto de tamaño

similar, pero de color, forma y textura distintos. Se dejó explorar al animal la arena durante 10 minutos.

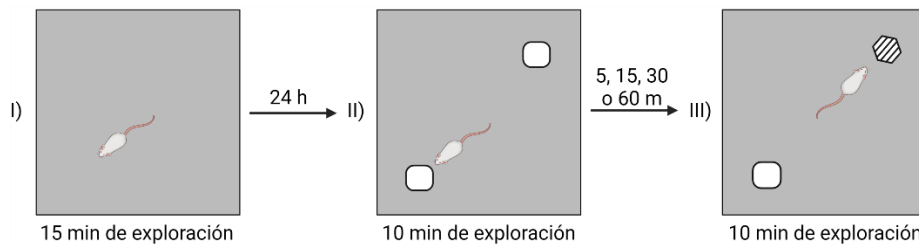


Figura 14. Test de reconocimiento de objeto nuevo. Representación ilustrada del protocolo empleado en esta tesis doctoral. El objeto rayado representa el objeto nuevo para el animal. Esquema realizado con Biorender.com.

La variante del test de reconocimiento de objeto nuevo empleada para evaluar la memoria fuerte y débil se realizó como se ha descrito previamente (Cinalli et al., 2020). A diferencia de la prueba estándar, donde en la fase de retención, se le permite al animal explorar libremente la arena con los dos objetos idénticos durante 10 minutos, en esta variante se estableció un tiempo máximo de interacción con los objetos. Para la memoria débil se dejó interactuar un máximo de 10 s acumulados con ambos objetos o 13 s con uno de los dos. Por otro lado, para la evaluación de la memoria fuerte se dejó interactuar a los animales durante un máximo de 30 s acumulados con ambos objetos o 38 s con alguno de los dos. Ambas pruebas se realizaron en un máximo de 10 minutos totales, si pasado este tiempo el animal no alcanzó el tiempo establecido de interacción con los objetos, se consideró no válido. La evaluación de la memoria se realizó en ambos casos 60 minutos después de la fase de retención.

Los objetos empleados como familiar o nuevo se aleatorizaron en grupos de 4-5 ratones de cada población. Durante las tres fases del test se grabó el comportamiento del ratón desde una vista cenital. Se cuantificó manualmente la interacción con los objetos familiares (fase II) o familiar y nuevo (fase III), considerando interacción cualquier evento de contacto directo del hocico del animal con los objetos.

6.6.2 Reconocimiento de objeto desplazado

Al igual que en la prueba de reconocimiento de objeto nuevo, este test se realizó en la arena del test de campo abierto. Consiste en las mismas tres fases: habituación al contexto, retención y reevaluación de la memoria. Los objetos idénticos en la fase de retención se colocaron en el eje central de la arena separados entre sí y separados de las paredes la misma distancia. En la fase de evaluación de la memoria, se mantienen los mismos objetos idénticos presentados en la fase de retención, pero uno de los dos se desplaza hacia una posición cercana a la esquina (Figura 15). Se cuantificó manualmente la interacción con los objetos familiares (fase II) o familiar y nuevo (fase III), considerando interacción cualquier evento de contacto directo del hocico del animal con los objetos.

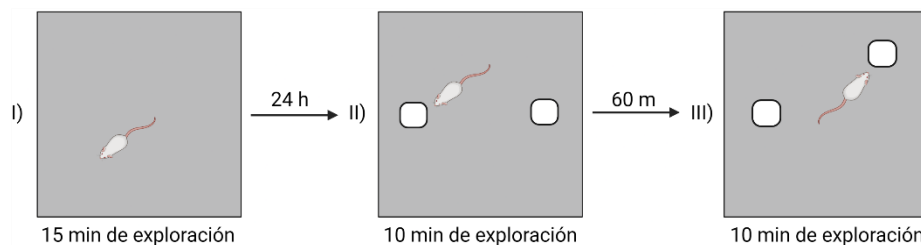


Figura 15. Test de reconocimiento de objeto desplazado. Esquema ilustrado del protocolo empleado en esta tesis doctoral. Esquema realizado con Biorender.com.

6.6.3 Laberinto de Barnes

La prueba del laberinto de Barnes se realizó como ha sido descrita previamente (Andrade-Talavera et al., 2015). Se empleó una plataforma redonda elevada que contiene 20 agujeros en la periferia a la misma distancia entre ellos (*Harvard Apparatus*). Se colocaron tres pistas visuales sobre paneles rodeando la plataforma. Durante la fase de aprendizaje, todos los agujeros menos uno, el agujero de escape, estaban cubiertos, dejando solo uno donde el animal puede refugiarse. Para inducir la respuesta de escape, se empleó luz a intensidad alta y ventiladores alrededor de la plataforma como estímulos aversivos. Se colocó al ratón en el centro de la plataforma y se dejó que encontrara el agujero de escape. Se realizaron cuatro entrenamientos diarios por ratón con un tiempo máximo para encontrar el agujero de escape de 180 segundos. En los casos de animales que superaran este tiempo sin encontrar el agujero de escape, se les guio cuidadosamente hacia el mismo. 24 horas después del entrenamiento, los ratones se evaluaron en una única sesión de 90 s de duración con todos los agujeros tapados. La plataforma se dividió en 4 cuadrantes de igual tamaño para su análisis, *target*, opuesto,

adyacente + y adyacente -. Se cuantificó el tiempo en alcanzar el agujero de escape y el tiempo permanecido en cada cuadrante de manera automática empleando el software *Smart (Panlab)*.

6.6.4 Condicionamiento al miedo

Para la prueba del condicionamiento al miedo se utilizó una caja de pruebas rectangular (*Harvard Aparatus*). La prueba consta de tres fases (Figura 16):

- I) Condicionamiento. Se colocó al animal en la caja y se dejó explorar durante dos minutos. A continuación, se le presentó un estímulo sonoro (80 dB, 3000 Hz) de 30 s, solapando los últimos 2 s con una descarga eléctrica (0.2 mA). Esta secuencia se repitió 3 veces más.
- II) A las 24 horas del condicionamiento, se colocó al animal en la misma caja durante 5 minutos para analizar su reacción ante el contexto.
- III) A continuación de la fase anterior, se cambió el color de las paredes y la forma de la caja para variar el contexto y se colocó al animal en la misma. Se le presentaron tres estímulos sonoros de las mismas características que en la fase de condicionamiento, pero sin ir acompañados de descarga eléctrica.

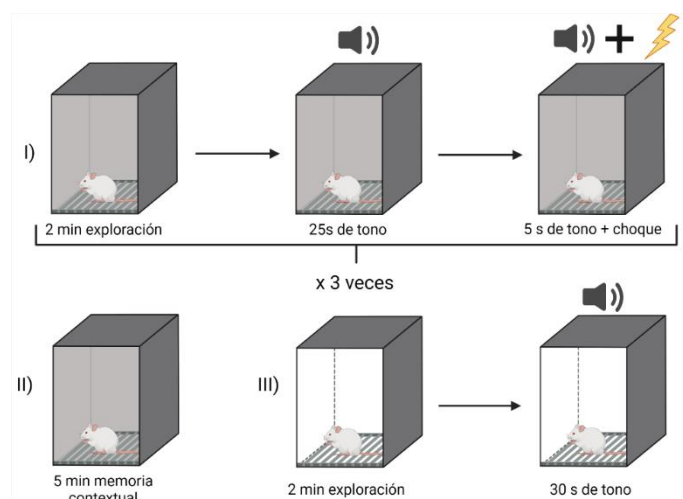


Figura 16. Test de condicionamiento al miedo. Esquema del protocolo seguido en esta tesis doctoral. Esquema realizado con Biorender.com.

La caja de pruebas consta de sensores en la base que detectan el movimiento del ratón. Empleando el programa *Packwin (PanLAB)* se analizó la respuesta de congelamiento de los animales ante los diferentes estímulos.

7 Anticuerpos empleados

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se emplearon los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo primario	Especie de origen	Casa comercial	Dilución de uso
Anti-APP (C-ter)	Conejo	Sigma-Aldrich	1:1000 (WB)
anti-APP (OC)	Conejo	Sigma-Aldrich	1:500 (IHQ)
anti-A β (82E1)	Ratón	Invitrogen	1:1000 (WB)
anti- β actina	Ratón	Sigma-Aldrich	1:5000 (WB)
anti-FLAG	Ratón	Sigma-Aldrich	1:1000 (WB), 1:500 (IF)
anti-GFAP	Ratón	DAKO	1:1000 (IHQ)
anti-GluR1	Ratón	Santa Cruz Biotech	1:1000 (WB)
anti-GluR2	Ratón	Neuromab	1:1000 (WB)
anti-HA	Rata	Roche	1:500 (WB) (IHQ)
anti-Iba1	Conejo	Synaptic Systems	1:1000 (IHQ)
anti-N-Cadherina	Ratón	BD Biosciences	1:1000 (WB)
anti-NeuN	Ratón	Millipore	1:1000 (WB, IHQ)
anti-Nlgn1 (C-ter)	Ratón	Neuromab	1:1000 (WB)
anti-Nlgn1 (4C12) (N-ter)	Ratón	Synaptic Systems	1:1000 (WB)
anti-Nlgn2	Ratón	Synaptic Systems	1:1000 (WB)
anti-Nlgn3	Ratón	Synaptic Systems	1:1000 (WB)
anti-Pan-Nrxn (Nrxn 1, 2, 3)	Conejo	Synaptic Systems	1:500 (WB)
anti-PS (C-ter)	Ratón	Millipore	1:500 (WB)
anti-PSD-95	Ratón	Thermo Scientific	1:1000 (WB)
anti-pTau (AT8)	Ratón	Thermo Scientific	1:200 (IHQ)
anti-Sinapsina	Cobaya	Synaptic Systems	1:500 (IF)
anti-VSV	Conejo	Synaptic Systems	1:500 (IF)

Tabla 6. Anticuerpos primarios empleados en esta Tesis Doctoral. WB: *Western blot*, IHQ: Inmunohistoquímica, IF: Inmunofluorescencia.

Anticuerpo primario	Especie de origen	Casa comercial	Dilución de uso
Anti-conejo-HRP	Cabra	Jackson ImmunoResearch	1:5000 (WB)
Anti-rata-HRP	Cabra	Jackson ImmunoResearch	1:5000 (WB)
Anti-ratón-HRP	Cabra	Jackson ImmunoResearch	1:5000 (WB)
Anti-cobaya-CY5	Asno	Jackson ImmunoResearch	1:800 (IF)
Anti-conejo-CY2	Asno	Jackson ImmunoResearch	1:800 (IF)
Anti-ratón-CY3	Asno	Jackson ImmunoResearch	1:800 (IF)
Anti-conejo-HRP	Cabra	Jackson ImmunoResearch	1:5000 (WB)
Anti-conejo-biotina	Cabra	Jackson ImmunoResearch	1:800 (IHQ)
Anti-rata- biotina	Cabra	Jackson ImmunoResearch	1:800 (IHQ)
Anti-ratón- biotina	Cabra	Jackson ImmunoResearch	1:800 (IHQ)

Tabla 7. Anticuerpos secundarios empleados en esta Tesis Doctoral. WB: *Western blot*, IHQ: Inmunohistoquímica, IF: Inmunofluorescencia.

IV. RESULTADOS

1 Interacción Neurexinas-Neuroliguinas

Las Nlgn1 tienen una expresión postsináptica diferencial. Nlgn1 se localiza en terminales glutamatérgicos y Nlgn2 en terminales GABAérgicos, mientras que Nlgn3 puede localizarse en ambos tipos de terminales (Ali et al., 2020; Budreck & Scheiffele, 2007; Pouloupoulos et al., 2009; Song et al., 1999). Además, aproximaciones *in vitro* han mostrado que la interacción entre isoformas de Nrnxns y Nlgn1 está regulada por *splicing* alternativo. La inserción del *splicing* B en Nlgn1 limita su interacción con isoformas de β Nrnxns que carecen del sitio SP4 (Boucard et al., 2005; Miller et al., 2011). Por otra parte, Nlgn2 carece naturalmente del sitio B de *splicing*, por lo que podría interactuar con α -y β Nrnxns (Chih et al., 2006; Koehnke et al., 2010). Estos datos han servido para apoyar la existencia de un código sináptico mediado por Nrnxns y Nlgn1 en contactos glutamatérgicos y GABAérgicos (Chih et al., 2006). Sin embargo, estos resultados se han obtenido mediante ensayos de interacción realizados *in vitro* con los ectodominios solubles de Nrnxns y/o Nlgn1 expresados por células no neuronales. Cabe destacar que la interacción trans-sináptica de Nrnxns y Nlgn1 podría modificarse en un contexto neuronal por mecanismos post-traduccionales y la presencia de otras proteínas que regulen al alza o a la baja dichas interacciones (Dai et al., 2022; Pettem, Yokomaku, Takahashi, et al., 2013; Singh et al., 2016). Por todo ello, es fundamental estudiar la interacción trans-sináptica de Nrnxns y Nlgn1 en un contexto neuronal. Existen dos limitaciones importantes que han impedido estudiar la interacción de isoformas de Nrnxns y Nlgn1 en contactos sinápticos. Una, es la falta de anticuerpos específicos para las distintas isoformas de Nrnxns. La segunda, es la ausencia de aproximaciones que permitan expresar pares concretos de Nrnxns y de Nlgn1 presentadas en membranas opuestas. Para abordar estas limitaciones, decidimos desarrollar un abordaje que nos permitiera expresar e identificar en neuronas isoformas concretas de Nrnxn1, para, posteriormente, poder analizar su reclutamiento a contactos sinápticos inducidos por isoformas de Nlgn1 expresadas en la membrana opuesta.

1.1 Marcaje de isoformas de α - y β -Nrxn1 mediante la inserción de un epítipo Flag

Mediante el método de *overlap extensión-PCR* insertamos la secuencia del epítipo Flag en el dominio citoplásmico de cuatro isoformas de *splicing* de Nrxn1: α Nrxn1SP4, α Nrxn1 Δ 4, β Nrxn1SP4 y β Nrxn1 Δ 4. La inserción de la etiqueta Flag se llevó a cabo en fase entre la Asparagina 420 y la Glicina 421 (número de aminoácidos correspondientes a la secuencia de β Nrxn1), 28 aminoácidos después del dominio transmembrana. Estas isoformas de Nrxn1 estaban marcadas previamente en el extremo N-terminal con la etiqueta HA. Dado que el extremo N-terminal de las diferentes isoformas de Nrxns es altamente polimórfico y participa en las interacciones con ligandos postsinápticos, razonamos que el marcaje del dominio citoplásmico común de Nrxns permitiría analizar la distribución de distintas isoformas de Nrxn1 de una forma más directamente comparable

Tras comprobar mediante secuenciación la correcta inserción en fase de la secuencia de ADN correspondiente a la etiqueta Flag, decidimos analizar si dicha inserción interfería de algún modo con la expresión de las proteínas marcadas. Para ello, se transfectaron células HEK 293T con vectores de expresión para HA- α Nrxn1 Δ 4 y β Nrxn1 Δ 4 marcados con y sin la etiqueta Flag y la expresión se analizó por Western-blot (Figura 17). El anticuerpo anti-HA detectó la expresión HA- α Nrxn1 Δ 4 como un doblete de bandas sobre 180 KDa, correspondientes al peso molecular de la proteína sin glicosilar, y bandas de mayor peso molecular, correspondientes con la proteína α Nrxn1 Δ 4 glicosilada. En los lisados de células transfectadas con HA- β Nrxn1 Δ 4., el anticuerpo HA detectó una banda mayoritaria a la altura de 50 KDa correspondiente al peso del núcleo proteico sin glicosilar, junto con bandas de mayor tamaño generadas por glicosilación (Figura 17). El patrón de expresión reconocido por el anticuerpo HA no se afectó por la inserción del epítipo Flag en HA- α Nrxn1 Δ 4 y en HA- β Nrxn1 Δ 4 (Figura 17). La menor movilidad electroforética de las distintas bandas de HA- β Nrxn1 Δ 4-Flag se debe a la inserción de la secuencia de 8 aminoácidos que codifican para Flag. Además, un anticuerpo contra Flag detectó de forma específica las proteínas HA- α Nrxn1 Δ 4-Flag y HA- β Nrxn1 Δ 4-Flag, pero no las mismas isoformas que carecían del epítipo (Figura 17). Estos datos indican que el

marcaje del dominio citoplásmico de Nrnx1 mediante la inserción de un epítipo Flag no afecta el patrón ni los niveles de expresión de las isoformas que lo contienen.

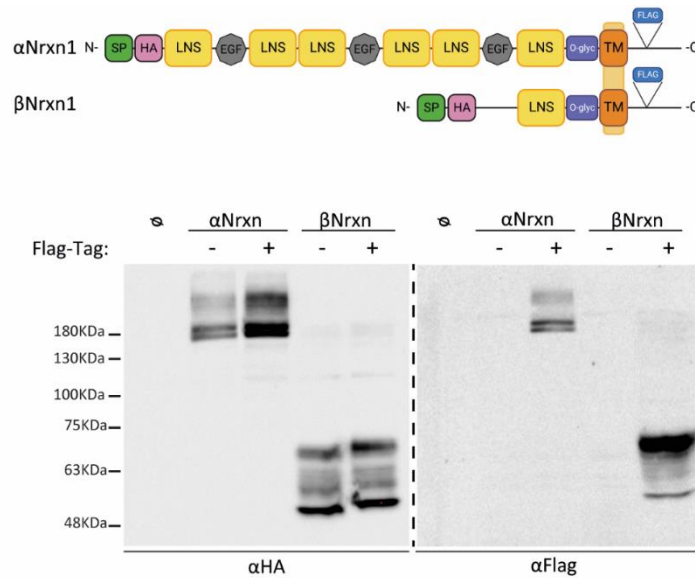
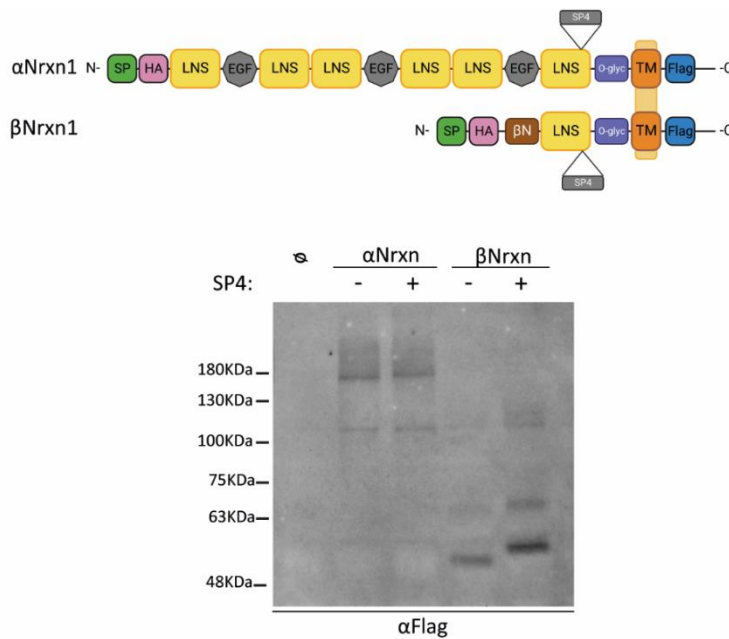


Figura 17. Expresión de α y β Nrnx1 en células HEK 293T marcadas con epítipos en los dominios extra e intracelular. Arriba, esquema representativo de las isoformas α - y β Nrnx1. Se muestra la localización de las etiquetas HA y Flag. SP: péptido señal; LNS: dominio Laminina/ Neurexina/ Globulina de unión a hormona sexual; EGF: factor de crecimiento epidermal; O-glyc: sitios de O-glicosilación; TM: dominio transmembrana. Abajo, *Western blot* de células HEK 293T transfectadas con α - y β Nrnx1 con y sin la etiqueta Flag (*Flag-Tag*) junto a células sin transfectar (\emptyset). A la izquierda, se empleó el anticuerpo anti-HA; a la derecha, se empleó el anticuerpo anti-Flag.

Una vez validada la aproximación para el marcaje, generamos mediante abordajes de biología molecular vectores lentivirales para la expresión de las isoformas de HA- α Nrnx1-Flag y HA- β Nrnx1-Flag, sin y con el sitio de *splicing* alternativo 4 (Figura 18). A continuación, generamos los correspondientes lentivirus recombinantes para cada una de las 4 isoformas de HA-Nrnx1-Flag y se infectaron cultivos de neuronas. Una ventaja de nuestros sistemas lentivirales es que emplean al promotor neuronal de sinapsina, dirigiendo, por tanto, la expresión de la proteína exógena específicamente a las neuronas del cultivo (Gascón et al., 2008). La expresión de las isoformas de Nrnx1 se analizó mediante Western-blot con un anticuerpo anti Flag. En lisados infectados con α Nrnx1 Δ 4 y α Nrnx1SP4 el anticuerpo anti-Flag detectó bandas en torno a los 180 KDa, junto con una serie de bandas de menor movilidad electroforética correspondientes con proteínas glicosiladas (Figura 18). En los lisados infectados con β Nrnx1 Δ 4 y β Nrnx1SP4, se detectó una banda mayoritaria a la altura de 50 KDa, además de bandas adicionales de proteínas glicosiladas en el rango de 70 -100 KDa. Se pudo apreciar un ligero incremento en el peso molecular de las isoformas que contienen el SP4 debido a la inserción de 37 aminoácidos, más evidente en el caso de β Nrnx1 por la resolución de los geles (Figura 18).



Cabe destacar la baja expresión relativa de α Nrnx1 respecto a β Nrnx1, presumiblemente debido al mayor tamaño de los vectores lentivirales de α Nrnx1, que pudo reducir el título viral. En resumen, la generación de vectores lentivirales que codifican para α - y β Nrnx1 marcadas con un epítipo, nos permiten dirigir la expresión en neuronas de isoformas de *splicing* concretas e identificar su distribución con anticuerpos específicos.

1.2 Interacción diferencial de isoformas de Neurexinas con isoformas de Neuroliginas en experimentos de co-cultivo

Mediante aproximaciones *in vitro*, el grupo de Thomas Südhof ha reportado que la presencia del sitio B de *splicing* en Nlgn1 le confiere una interacción preferente con isoformas de β Nrxns Δ 4, mientras que isoformas de Nlgn1 que carecen del sitio B pueden interaccionar con isoformas de α - y β Nrnx (Boucard et al., 2005; Chih et al., 2006). Para profundizar cómo la presencia o ausencia de SP4 en Nrns modula la interacción trans-sináptica con Nlgn nos valimos de la capacidad de Nlgn de disparar el reclutamiento axonal de Nrns y la inducción de terminales presinápticos en los axones que contactan a la célula transfectada (Dean et al., 2003; Scheiffele et al., 2000). En primer lugar, se infectaron cultivos de corteza con lentivirus recombinantes que codifican para α Nrnx1SP4, α Nrnx1 Δ 4, β Nrnx1SP4 y β Nrnx1 Δ 4, todas las isoformas marcadas con un

epítipo Flag. El título viral de cada una de las construcciones se ajustó para producir la expresión de las distintas isoformas a niveles comparables. Tras 12-13 días de infección, cada uno de los cultivos se co-cultivarón con células HEK 293T previamente transfectadas con VSV-Nlgn1 (A,B) o con VSV-Nlgn2 (A). Como control negativo de reclutamiento se empleó células HEK 293T transfectadas con GFP. Los cultivos de neuronas se fijaron 24 horas después de establecer el co-cultivo. De esta manera, podemos estudiar el reclutamiento de las isoformas de Nrnx1 a los axones que contactan a células HEK 293T que expresan Nlgn1 o Nlgn2 en su membrana mediante anticuerpos anti Flag y anti VSVs, respectivamente.

Las imágenes de inmunofluorescencia mostraron un bajo reclutamiento de α Nrxn1 Δ 4 y α Nrxn1SP4 a los contactos sinápticos inducidos por Nlgn1 en las células HEK 293T, como se puede observar al comparar los niveles de expresión con las zonas de no contacto en el mismo campo (Figura 19). Sin embargo, se observó un reclutamiento evidente de α Nrxn1 Δ 4 y α Nrxn1SP4 a los contactos sinápticos mediados por Nlgn2 (Figura 19). Los niveles de expresión de Nlgn1 y Nlgn2 fueron comparables entre los dos tipos de experimentos. El análisis cuantitativo mostró un reclutamiento preferente de α Nrxn1 por Nlgn2. La inserción de SP4 redujo el reclutamiento de α Nrxn1 inducido por Nlgn2.

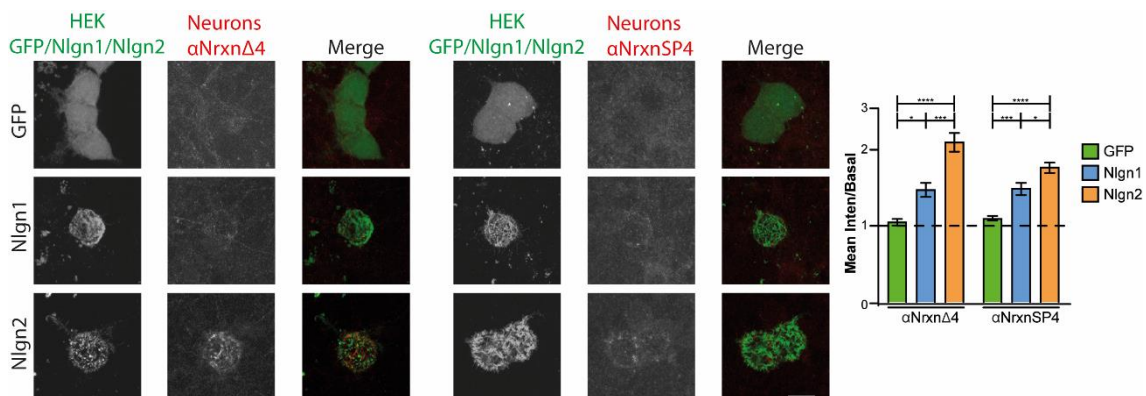


Figura 19. Reclutamiento preferente de isoformas de α Nrxn1 por Nlgn2. Nlgn1 y Nlgn2 expresadas en las células HEK 293T inducen el reclutamiento de Nrnxns. Se muestran proyecciones máximas de confocal. Cultivos neuronales infectados durante 13 días *in vitro* para expresar HA- α Nrxn1 Δ 4-Flag (izquierda) y HA- α Nrxn1SP4-Flag (derecha)(rojo). Células HEK 293T transfectadas con VSV-Nlgn1, VSV-Nlgn2 o GFP (verde). Se emplearon los anticuerpos anti-VSV y anti-Flag. GFP se detectó por la autofluorescencia. Se muestra la cuantificación de la intensidad media de α Nrxn1 en la zona de contacto con las células HEK 293T normalizada con la expresión en zonas vecinas sin contacto. ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan la SEM.

Al contrario de los resultados obtenidos con las isoformas de α Nrxn1, Nlgn1 produjo un robusto reclutamiento de β Nrxn1 Δ 4 en los terminales presinápticos (Figura 20). La inserción de SP4 redujo los niveles de β Nrxn1 reclutada en los sitios de contacto con Nlgn1. De forma similar, encontramos que Nlgn2 reclutó a β Nrxn1 Δ 4 a unos niveles igualmente altos que los obtenidos por Nlgn1. La inserción del SP4 redujo el reclutamiento de β Nrxn1 Δ 4 a los contactos sinápticos mediados por Nlgn1 y Nlgn2.

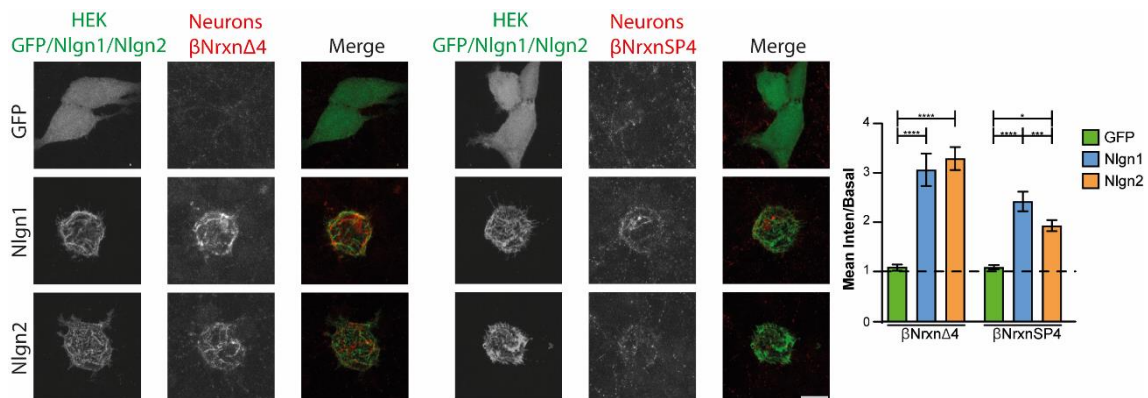


Figura 20. Reclutamiento de isoformas de β Nrxn1 por Nlgn1 y Nlgn2. Nlgn1 y Nlgn2 en las células HEK 293T inducen el reclutamiento de Nrxns. Se muestran proyecciones máximas de confocal. Cultivos neuronales infectados durante 13 días *in vitro* para expresar HA- β Nrxn1 Δ 4-Flag (izquierda) y HA- β Nrxn1SP4-Flag (derecha) (rojo). Células HEK 293T transfectadas con VSV-Nlgn1, VSV-Nlgn2 o GFP (verde). Se emplearon los anticuerpos anti-VSV y anti-Flag. GFP se detectó por la autofluorescencia. Se muestra la cuantificación de la intensidad media de β Nrxn1 en la zona de contacto con células HEK 293T normalizada con la expresión en zonas vecinas sin contacto. ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan la SEM.

En conjunto, estos datos indican que las isoformas de β Nrxn1 son receptores presinápticos tanto para Nlgn1 como para Nlgn2, mientras que las isoformas de α Nrxn1 son receptores presinápticos para Nlgn2, pero no para Nlgn1. La inserción de SP4 modula a la baja el reclutamiento de α - y β Nrxn1.

1.3 Interacción diferencial de isoformas de Neurexinas con isoformas de Neuroliquinas en un contexto neuronal.

Los experimentos de co-cultivo anteriores indicaron que Nlgn1 en el terminal postsináptico glutamatérgico se une específicamente con β Nrxn1, pero no con α Nrxn1, en el terminal presináptico. Para obtener evidencias adicionales, desarrollamos un protocolo que nos permitió analizar la interacción de isoformas de Nrxns y Nlgn entre neuronas pre- y postsinápticas.

En estos experimentos se infectaron cultivos de neuronas corticales con lentivirus de α Nrxn1SP4, α Nrxn1 Δ 4, β Nrxn1SP4 y β Nrxn1 Δ 4. Tras 13 días *in vitro*, los cultivos se transfectaron con VSV-Nlgn1. Debido a la baja eficiencia de transfección de los cultivos neuronales, se consiguió la expresión de VSV-Nlgn1 en neuronas individualizadas que, a su vez, se encontraban rodeadas de neuronas que expresan las isoformas de Nrxn1 por la alta eficiencia de la transducción lentiviral. La expresión de Nlgn1 y de las isoformas de Nrxn1 se analizaron en experimentos de inmunofluorescencia empleando los anticuerpos anti-VSV y anti-Flag, respectivamente. Además, los cultivos se tiñeron en paralelo con anticuerpos contra sinapsina para identificar los contactos presinápticos.

Las imágenes de confocal mostraron que Nlgn1 expresada en dendritas no indujo el reclutamiento de α Nrxn1SP4 ni de α Nrxn1 Δ 4 a los contactos presinápticos (Figura 21). Sin embargo, Nlgn1 sí incrementó la densidad de contactos presinápticos, como era de esperar (Dean et al., 2003). Por el contrario, β Nrxn1SP4 y β Nrxn1 Δ 4 sí se reclutaron a los terminales presinápticos que contactaban a las dendritas transfectadas con Nlgn1 (Figura 21). La cuantificación de estos experimentos mostró un incremento en el reclutamiento de β Nrxn1 Δ 4 de hasta cuatro veces sobre la expresión basal. El reclutamiento de β Nrxn1SP4, siendo evidente, fue de una magnitud ligeramente menor, en consonancia con un efecto modulador negativo de SP4 (Figura 21). Además, la cuantificación demostró que la densidad los *puncta* de sinapsina inducidos por la transfección de Nlgn1 se vieron incrementados aún más con la expresión de β Nrxn1 Δ 4. De igual forma, la longitud y densidad de las espinas dendríticas inducidas por Nlgn1 parecían haberse incrementado con la expresión de β Nrxn1 Δ 4, aunque este efecto no se cuantificó. Estos datos indican que la interacción de β Nrxn1 Δ 4 con Nlgn1 tiene un papel funcional promoviendo la diferenciación sináptica glutamatérgica.

Estos resultados indican que Nlgn1 en el terminal postsináptico glutamatérgico recluta a β Nrxn1 a los terminales presinápticos que contactan. La inserción de SP4 en β Nrxn1 reduce, pero no bloquea, la interacción con Nlgn1. Por el contrario, α Nrxn1 se encuentra ausente en los terminales presinápticos glutamatérgicos que contactan con Nlgn1. Sin embargo, Nlgn2 en el terminal postsináptico GABAérgico puede reclutar tanto

a α Nrxn1 como a β Nrxn1. La interacción selectiva de Nlgn1 con β Nrxn1 indica un papel preferente para estas isoformas de Nrxns en las sinapsis glutamatérgicas.

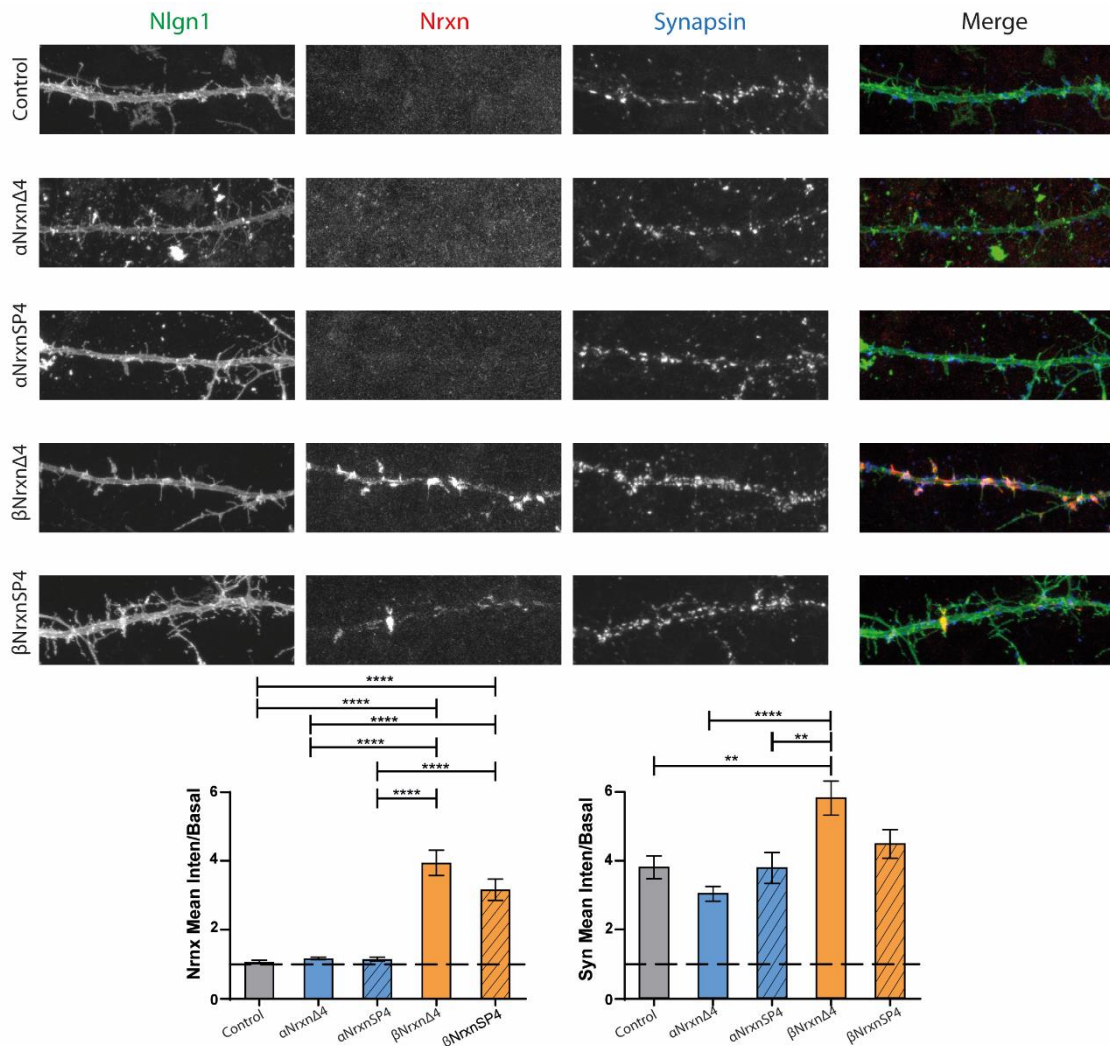


Figura 21. Reclutamiento de Nrxns por Nlgn1 en sistemas neuronales. Nlgn1 en células neuronales induce el reclutamiento de Nrxns. Se muestran proyecciones máximas de confocal. Cultivos neuronales infectados durante 13 días *in vitro* para expresar HA- α - y β Nrxn1-Flag con y sin el SP4 (rojo). Células neuronales transfectadas con VSV-Nlgn1 (verde). Detección del patrón de sinapsina endógeno (azul). Se emplearon los anticuerpos anti-VSV, anti-Flag y anti-sinapsina. Se muestra la cuantificación de la intensidad media de Nrxns en la zona de contacto con neuronas transfectadas con Nlgn1 normalizada con la expresión en zonas vecinas sin contacto. ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan la SEM.

2 Control temporal de la función de Presenilina, generación del modelo animal PScKO^{temp}

El envejecimiento es el factor no genético más relevante en AD. Incluso en pacientes con mutaciones de pérdida de función causantes de AD en los genes *PSEN1/2* los síntomas de la enfermedad aparecen tras décadas de vida (Kumar et al., 2022; Long & Holtzman, 2019). Sin embargo, se desconoce porqué los síntomas asociados a AD no aparecen hasta una edad relativamente avanzada. Existen dos posibilidades generales, la progresión de un mecanismo patogénico durante la primera etapa asintomática que antecede a la aparición de los síntomas; o la existencia de un momento del envejecimiento especialmente sensible a la falta de función de PS/ γ -secretasa que explique la aparición de los síntomas. En la primera posibilidad, la aparición y progresión de síntomas y los mecanismos responsables ocurrirían de igual manera a cualquier edad que se produjera la pérdida de PS/ γ -secretasa. En el segundo escenario, los mecanismos patogénicos responsables de la aparición y progresión de los síntomas asociados a AD dependerían de una determinada edad durante el envejecimiento.

El abordaje experimental empleado previamente por otros grupos para el estudio de la pérdida de función de PS ha consistido en la generación un mutante condicional de pérdida de función de PS1 en neuronas glutamatérgicas del cerebro postnatal de ratones PS2 KO (Ratones PScKO: PS1^{f/f}; PS2^{-/-}; CAMKII-Cre) (Aoki et al., 2009; Beglopoulos et al., 2004; Saura et al., 2004; Watanabe et al., 2014; Wines-Samuels et al., 2010). En los ratones PScKO, se han descrito defectos sinápticos y de memoria tempranos seguidos de una clara neurodegeneración, neuroinflamación e hiperfosforilación de Tau, recapitulando los principales defectos asociados a AD. Sin embargo, debido a que la pérdida de función de PS en los ratones PScKO ocurre en el primer mes postnatal (Saura et al., 2004), se desconoce el efecto que una pérdida de función de PS podría provocar en el cerebro envejecido. Hay datos que apuntan a que la pérdida de función de PS actúa de manera diferencial en función del momento del desarrollo en el que ocurra. Por ejemplo, la regulación de Notch y sus efectores difieren entre el cerebro embrionario y el adulto con respecto a su dependencia de la función de PS1 (Huakui Yu et al., 2001; W. Y. Kim & Shen, 2008).

Para poder ejercer un control temporal en la pérdida de función de PS durante el envejecimiento, en el grupo hemos generado un nuevo modelo animal, los animales PS cKO^{temp} (PS1 $^{f/f}$; PS2 $^{-/-}$; CaMKII-CreERT2) (Figura 22). En estos ratones, la escisión del gen *Psen1* se realiza mediante el sistema de recombinación Cre/loxP regulada por la proteína CreERT2. Esta proteína es una versión fusionada de la recombinasa Cre con el receptor de estrógenos humano, que le confiere una localización citoplásmica impidiendo así su función (Feil et al., 1997). Con la administración de tamoxifeno, un análogo de estrógenos, la proteína CreERT2 unida a tamoxifeno se transloca al núcleo, donde tiene lugar la recombinación de los sitios loxP que flanquean *Psen1* y por tanto su escisión. La proteína CreERT2 se encuentra clonada bajo el control del promotor CaMKII, dirigiendo así la expresión a las neuronas glutamatérgicas del prosencéfalo adulto a partir las primeras semanas postnatales (Erdmann et al., 2007). De esta manera, conseguimos la escisión de *Psen1* en neuronas glutamatérgicas mediante la actividad CaMKII, de igual manera que ocurre en los animales PS cKO (Saura et al., 2004). Pero, a diferencia del ratón PS cKO , la administración de tamoxifeno nos permite controlar temporalmente la escisión de *Psen1* en cualquier momento del envejecimiento (Figura 22).

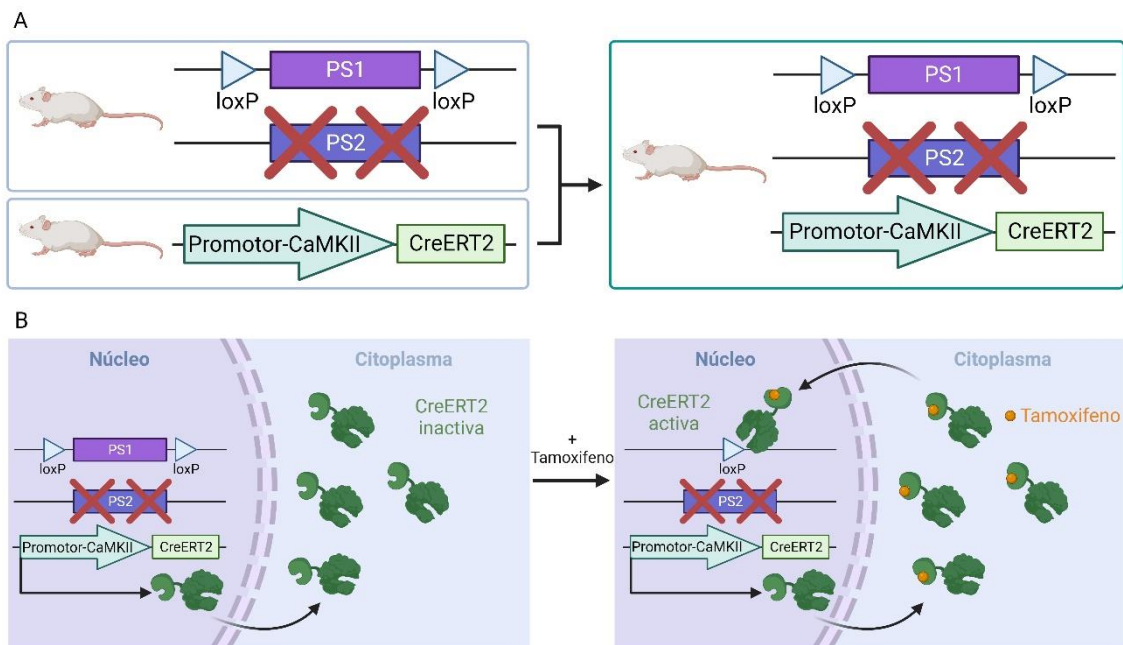


Figura 22. Generación del modelo animal PS cKO^{temp} y funcionamiento del sistema de inducción por tamoxifeno. A.- Generación del modelo animal PS cKO^{temp} mediante el cruce de animales PS1 $^{f/f}$;PS2 $^{-/-}$ con animales CaMKII-CreERT2, obteniendo así animales con los 3 alelos en heterocigosis. Posteriormente se cruzaron con animales PS1 $^{f/f}$;PS2 $^{-/-}$ para así obtener PS1 $^{f/f}$; PS2 $^{-/-}$; CaMKII-CreERT2 **B.-** Funcionamiento del sistema de inducción por tamoxifeno. El promotor CaMKII dirige la expresión de la proteína de fusión CreERT2 que es transportada al citoplasma donde no tiene actividad. Tras la administración de tamoxifeno y su unión con el receptor de estrógenos, la proteína CreERT2 es translocada al núcleo donde ejerce su función recombinando los sitios loxP que flanquean al gen de *Psen1* causando su escisión. Esquema generado con Biorender.com

2.1 Validación del modelo temporal inducible PScKO^{temp}

En primer lugar, abordamos la validación funcional del modelo PScKO^{temp} inducible desarrollado en el grupo. Para ello, a los animales PScKO^{temp} se les indujo la escisión de *Psen1* a las 4 semanas postnatales, a los que llamamos ratones PScKO^{young}, emulando la pérdida de función de PS que sufren los ratones PScKO dirigida por el promotor CaMKII en la misma ventana temporal (Saura et al., 2004). De esta manera, los resultados obtenidos en los ratones PScKO^{young} se podrían comparar con los datos publicados para los ratones PScKO, que nos llevará a validar la escisión regulable en el tiempo de *Psen1* en el nuevo modelo PScKO^{temp}. Además, para obtener las primeras evidencias experimentales del funcionamiento de la escisión de *Psen1* durante el envejecimiento, generamos ratones PScKO^{adult}, a los que se les administró tamoxifeno al séptimo mes de vida.

2.1.1 Análisis de la escisión de *Psen1* en el modelo PScKO^{temp}

Para comprobar la escisión de *Psen1*, se realizaron experimentos de *Western blot* empleando lisados de animales PScKO^{young} de 7 meses de edad y de ratones PScKO^{adult} a los 13 meses de edad, es decir, 6 meses después del tratamiento en ambos casos. Como controles se emplearon animales PS1^{f/f}; PS2^{-/-} tratados con tamoxifeno en paralelo. Para la detección de PS1 se utilizó un anticuerpo que reconoce a la proteína en su extremo C-terminal. Se observó una clara reducción en los niveles de PS1 en los animales PScKO^{young} respecto a animales controles tanto en hipocampo, donde los niveles de PS1 alcanzaron una reducción superior al 80%, como en corteza, donde observamos una reducción de más de un 50% (Figura 23). Observamos una notable reducción de PS1 tanto en hipocampo como en corteza de los animales PScKO^{adult} a niveles similares a los ratones PScKO^{young} (Figura 23). La detección de PS1 que permanece tanto en animales PScKO^{young} como en ratones PScKO^{adult} se debe, muy probablemente, a la expresión de PS1 en células neuronales y no neuronales donde no esté activo el promotor CaMKII (Saura et al., 2004).

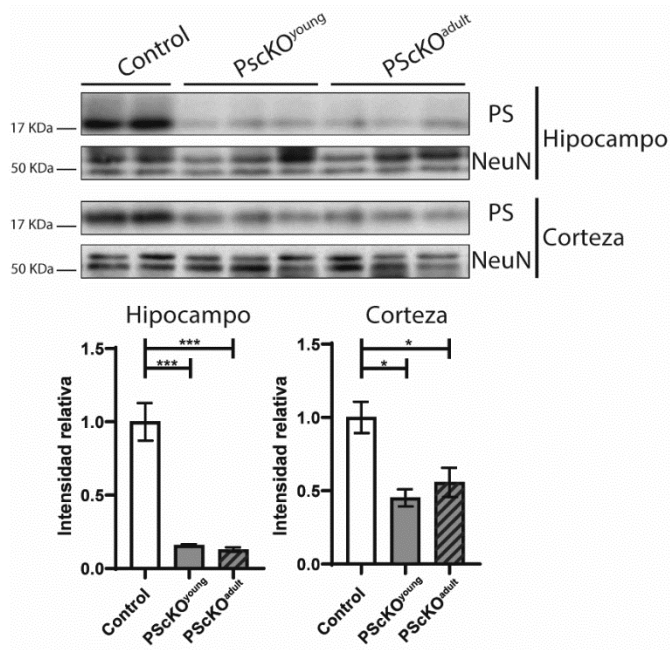


Figura 23. Niveles de PS1 en animales PScKO^{young} y PScKO^{adult}. Arriba, *Western blot* de lisados provenientes de hipocampo y corteza de animales PScKO^{young} y PScKO^{adult}. Se detectaron los niveles de PS1 empleando anticuerpo anti-PS1 C-ter. Abajo, se muestran las cuantificaciones de la intensidad de PS1 normalizada por NeuN y relativa al promedio de los controles. N= 3 controles, 3 PScKO^{young}, 3 PScKO^{adult}. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Estos resultados indican que la administración de tamoxifeno a los animales permite el correcto control temporal sobre la escisión de *Psen1* en el cerebro de animales durante el envejecimiento.

2.1.2 Procesamiento proteolítico de sustratos de γ -secretasa en el modelo animal PScKO^{temp}

Cuando la función de PS se ve interrumpida, los fragmentos CTFs de sus diferentes sustratos se acumulan. Se han identificado más de 150 sustratos distintos de PS/ γ -secretasa (Güner & Lichtenthaler, 2020). Para confirmar a nivel funcional la pérdida de función de PS, analizamos la acumulación de sustratos de γ -secretasa seleccionados en el cerebro de los animales PScKO^{young} y PScKO^{adult}. Para estos experimentos, seleccionaron sustratos de PS/ γ -secretasa ampliamente estudiados como APP y N-Cadherina (V. Blanchard et al., 2003; de Strooper et al., 1998; Marambaud et al., 2003; Philippe Marambaud et al., 2002) y sustratos de especial relevancia para el grupo como Nrnxns y Nlgn1 (Peixoto et al., 2012; Saura et al., 2011; Suzuki et al., 2012).

En experimentos de Western-blot observamos un claro incremento de APP-CTF, N-Cadh-CTF y Nrnx-CTF en lisados de hipocampo y corteza de animales PScKO^{young} y PScKO^{adult} (Figura 24). Nlgn1-CTF se detectó débilmente en hipocampo, pero no en corteza (Figura 24). Cabe destacar que el nivel de acumulación de APP-CTF, N-Cadh-CTF

y Nrnx-CTF fue comparable en animales PScKO^{young} y PScKO^{adult} (Figura 24). Estos datos indican que en el modelo PScKO^{temp} podemos generar una pérdida de función de PS/ γ -secretasa regulable con tamoxifeno en cualquier momento de la vida adulta.

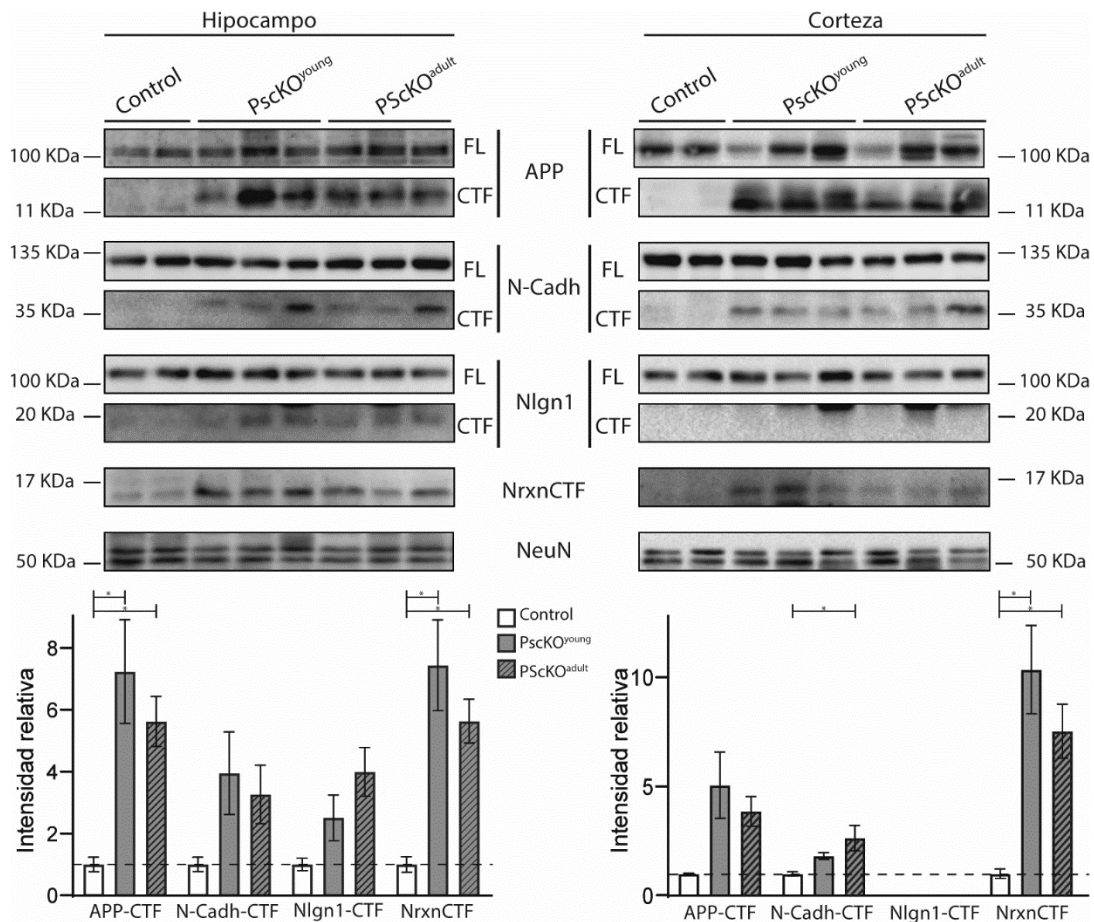


Figura 24. Expresión de distintos sustratos de PS en animales PScKO^{young} y PScKO^{adult}. Arriba, experimentos de *Western blot* con lisados provenientes de hipocampo y corteza de animales PScKO^{young} y PScKO^{adult}. Se indican los diferentes anticuerpos empleados. Abajo, se muestran las cuantificaciones de la intensidad de diferentes CTFs normalizadas a la correspondiente proteína madura. NrnxCTF se normalizó al control de carga, debido al alto número de isoformas de Nrns. N= 3 controles, 3 PScKO^{young}, 3 PScKO^{adult}. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey para cada CTF analizado. * p<0.05.

2.1.3 Análisis histológico del cerebro de ratones PScKO^{young}

Los efectos neurodegenerativos en el ratón PScKO han sido estudiados previamente (Saura et al., 2004; Watanabe et al., 2014; Wines-Samuelson et al., 2010). Como última fase de la caracterización del modelo animal, decidimos analizar si el fenotipo neurodegenerativo de los ratones PScKO se reproduce de forma similar en los ratones PScKO^{young}. Para ello, realizamos un análisis histológico en animales PScKO^{young} a los 7, 13 y 18 meses. Estas edades se seleccionaron en base a los datos publicados de los

animales PScKO que describen neurodegeneración, microgliosis y astrogliosis desde los 6 hasta los 22 meses de edad (Watanabe et al., 2014; Wines-Samuels et al., 2010). Como control se emplearon animales $PS1^{f/f}$; $PS2^{-/-}$ de la misma edad y tratados con tamoxifeno en paralelo.

2.1.3.1 Neurodegeneración en animales PScKO^{temp}

La densidad neuronal en los animales PScKO^{young} se analizó en cortes coronales de cerebro con el anticuerpo NeuN. En estas tinciones realizamos además las medidas de grosor de regiones cerebrales.

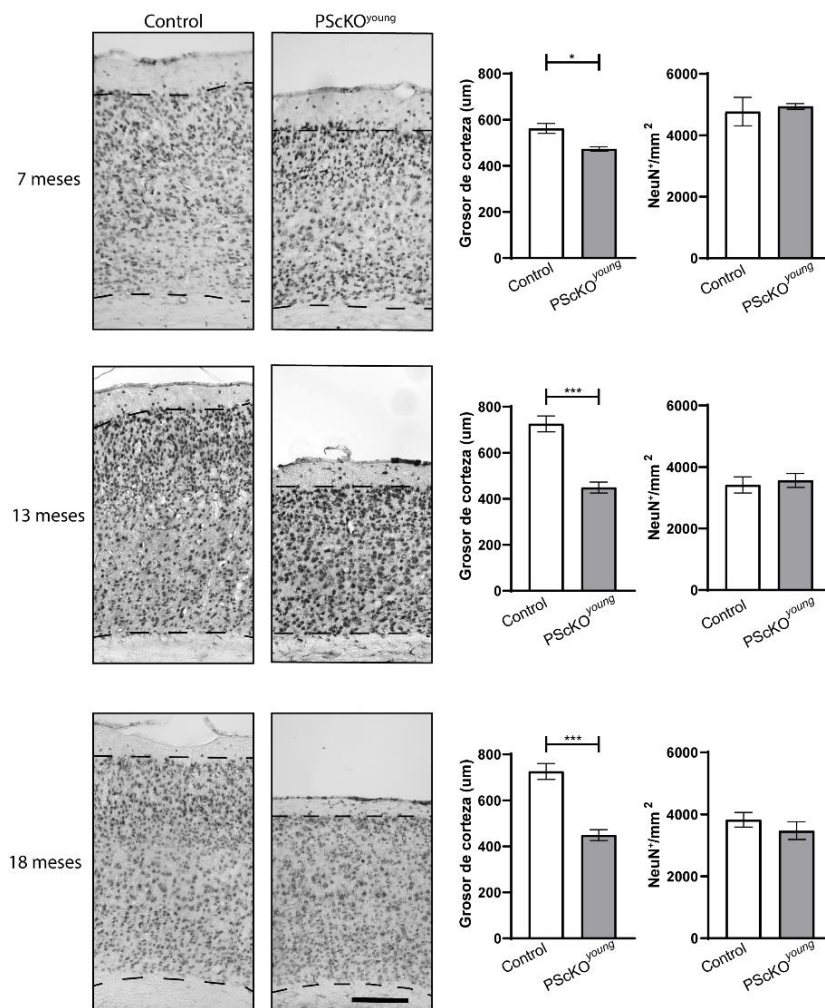


Figura 25. Neurodegeneración cortical en animales PScKO^{young}. A la izquierda, imágenes representativas de secciones de corteza de animales PScKO^{young} de 7, 13 y 18 meses teñidas con NeuN. La barra de escala representa 200 µm, la línea discontinua delimita el cuerpo calloso. A la derecha, cuantificación del grosor de corteza y densidad de células NeuN⁺. N= 3 controles, 3 PScKO^{young} de 7 meses; 5 controles, 5 PScKO^{young} de 13 meses; 3 controles, 3 PScKO^{young} de 18 meses; 4-5 cortes por animal. Análisis estadístico *t-test*. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Las barras de error representan la SEM.

El grosor de corteza se analizó desde el comienzo de la capa II hasta la capa VI. Pudimos observar una disminución del grosor de corteza en animales PScKO^{young} respecto a animales controles de un 16% a los 7 meses de edad. Este descenso se ve incrementado a un 38% a los 13 meses de edad y se mantuvo con una magnitud similar a los 18 meses. (7 meses, control: $562,1 \pm 21.51$, PScKO^{young}: $473,3 \pm 10.28$; 13 meses, control: $722.5 \pm$

34.64, PScKO^{young}: 449.0 ± 23.54; 18 meses, control: 699.3 ± 60.24, PScKO^{young}: 465.5 ± 35.89. Unidades: $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) (Figura 25). En cuanto a la densidad neuronal, cuantificada como número de células NeuN⁺, no se observaron diferencias entre los ratones PScKO^{young} y animales controles en ninguna de las edades ensayadas (7 meses, control: 4767 ± 465.4, PScKO^{young}: 4936 ± 91; 13 meses, control: 3418 ± 262.6, PScKO^{young}: 3563 ± 228.3; 18 meses, control: 3826 ± 238.7, PScKO^{young}: 3470 ± 283. Unidades: células NeuN⁺/mm² ± SEM) (Figura 25). Estos datos muestran un descenso progresivo en el grosor de corteza en animales PScKO^{young} que se estabiliza a los 13 meses de edad, mientras que la densidad de neuronas corticales no se ve afectada, indicando por tanto una reducción en el número absoluto de neuronas.

Estos resultados reproducen el descenso en masa cortical encontrado en los animales PScKO en otros estudios (Saura et al., 2004; Watanabe et al., 2014; Wines-Samuelson et al., 2010). En estos estudios, los autores observaron un descenso del volumen cortical en animales PScKO del 35% a los 8 meses que progresa a un 50% a los 16 meses donde parece estabilizarse, ya que se mantiene en este porcentaje a los 22 meses.

2.1.3.2 Astrogliosis en los animales PScKO^{young}

Otro de los marcadores principales en AD es la aparición de astrogliosis o incremento en la densidad de astrocitos. Analizamos la astrogliosis en cortes de cerebro de animales PScKO^{young} de 7, 13 y 18 meses realizando experimentos de inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti-GFAP (proteína ácida fibrilar glial, por sus siglas en inglés). Esta tinción nos permitió estimar el porcentaje de área cerebral ocupada por astrocitos.

En la corteza de animales PScKO^{young} de 7 meses de edad encontramos un 16% del área teñida por GFAP, mientras que en animales controles ocupó únicamente el 9% (Figura 26). El incremento en el área ocupada por GFAP en los animales PScKO^{young} alcanzó el 20% a la edad de 13 meses donde parece mantenerse a los 18 meses (7 meses, control: 9.481 ± 1.31, PScKO^{young}: 16.92 ± 1.39; 13 meses, control: 7.40 ± 0.94, PScKO^{young}: 20.76 ± 2.16; 18 meses, control: 4.53 ± 0.67, PScKO^{young}: 21.07 ± 0.70. Unidades: % de

área GFAP⁺ ± SEM) (Figura 26). Las cuantificaciones revelaron un incremento en la astrogliosis en animales PScKO^{young} que se estabiliza a los 13 meses de edad.

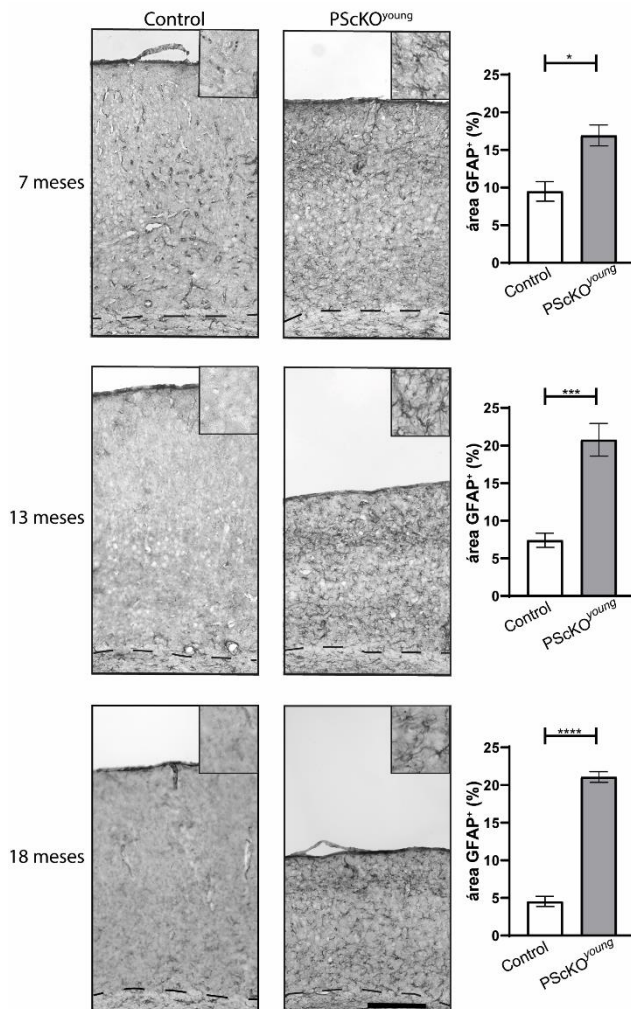


Figura 26. Astroglia cortical en animales PScKO^{young}. A la izquierda, imágenes representativas de secciones de corteza de animales PScKO^{young} de 7, 13 y 18 meses teñidas con anti-GFAP. La barra de escala representa 200 μm, la línea discontinua delimita el cuerpo caloso. A la derecha, cuantificación del porcentaje de área teñida. N a 7 meses= 3 controles, 3 PScKO^{young}; a 13 meses 5 controles, 5 PScKO^{young}; a 18 meses 3 controles, 3 PScKO^{young}; 4-5 cortes por animal. Análisis estadístico *t-test*. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan la SEM.

Por otro lado, en el hipocampo encontramos cierta dificultad a la hora de analizar la astrogliosis en los animales PScKO^{young} debido a la propia abundancia relativa de astrocitos en esta área del cerebro en animales controles. Encontramos un incremento no significativo en el área teñida por GFAP en el hipocampo de los animales PScKO^{young} de 7 meses de edad. Este incremento se vuelve significativo a la edad de 13 meses, siendo el área GFAP⁺ en los animales PScKO^{young} el doble de la presente en los animales controles. A los 18 meses, los animales controles presentan un incremento del área teñida y no se observaron diferencias respecto a los PScKO^{young} (7 meses, control: 16.23 ± 2.44 , PScKO^{young}: 20.67 ± 2.86 ; 13 meses, control: 12.76 ± 0.93 , PScKO^{young}: 20.86 ± 1.81 ; 18 meses, control: 20.11 ± 4.63 , PScKO^{young}: 24.83 ± 2.24 . Unidades: porcentaje de área GFAP⁺ ± SEM) (Figura 27).

En otros estudios donde se analizó la población de células GFAP⁺ en animales PScKO, los autores encontraron un incremento progresivo del área teñida por GFAP en la corteza pasando de un 20% observado a los 4 meses a duplicarse a los 16 meses. Curiosamente, en Watanabe et al., 2004 también tuvieron dificultades a la hora de analizar el área teñida por GFAP en el hipocampo, debido a los altos niveles de GFAP en esta región cerebral en animales controles y a su elevada variabilidad. En animales PScKO observaron un incremento del área teñida por GFAP en el hipocampo del 14% a la edad de 4 meses que pasaba a un 38% a los 16 meses (Saura et al., 2004; Watanabe et al., 2014; Wines-Samuelson et al., 2010).

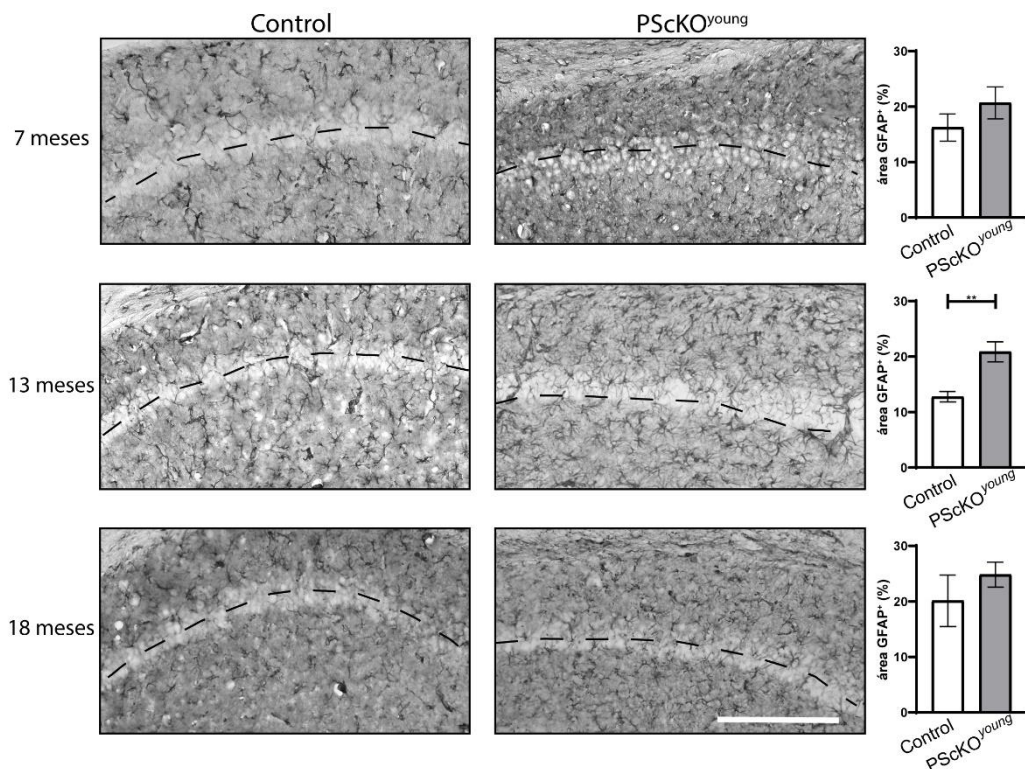


Figura 27. Astrogliosis hipocampal en animales PScKO^{young}. A la izquierda, imágenes representativas de secciones de hipocampo de animales PScKO^{young} de 7, 13 y 18 meses teñidas con anti-GFAP. Se muestra un detalle de la región CA1 el hipocampo. La línea discontinua indica la capa piramidal. La barra de escala representa 200 μ m. A la derecha, cuantificación del porcentaje de área teñida. N a 7 meses= 3 controles, 3 PScKO^{young}; a 13 meses 5 controles, 5 PScKO^{young}; a 18 meses 3 controles, 3 PScKO^{young}. 4-5 cortes por animal. Análisis estadístico *t*-test. ** $p < 0.01$. Las barras de error representan la SEM.

2.1.3.3 Microgliosis en animales PScKO^{young}

La proliferación y activación de la microglía en el cerebro es otra de las características principales en AD. Para estudiar la microglía empleamos cortes de cerebro

de animales PScKO^{young} de 7, 13 y 18 meses de edad. Se realizó una tinción empleando el anticuerpo anti-Iba1, marcador de microglía. Analizamos tanto el número de células Iba1⁺ como el porcentaje de área teñida.

En la corteza de los animales PScKO^{young} de 7 meses encontramos un incremento en el número de células Iba1⁺ tres veces superior al encontrado en la corteza de animales controles. Este incremento en densidad se mantuvo a los 13 y 18 meses (7 meses, control: 157.2 ± 14.90, PScKO^{young}: 471.4 ± 29.11; 13 meses, control: 193.4 ± 11.47, PScKO^{young}: 589.7 ± 46.83; 18 meses, control: 183.6 ± 7.57, PScKO^{young}: 500.6 ± 28.34. Unidades: células Iba1⁺/mm² ± SEM) (Figura 28). Por otro lado, en cuanto al porcentaje de área teñida por Iba1 encontramos un incremento de un 30% en los animales PScKO^{young} de 7 meses, que aumentó al 50% a los 13 meses y progresó hasta observarse un área teñida por Iba1 2.3 veces superior en los animales PScKO^{young} de 18 meses respecto a animales controles (7 meses, control: 13.39 ± 0.49, PScKO^{young}: 19.87 ± 1.94; 13 meses, control: 13.20 ± 0.51, PScKO^{young}: 20.51 ± 1.39; 18 meses, control: 11.24 ± 0.39, PScKO^{young}: 24.96 ± 0.94. Unidades: porcentaje de área Iba1 ± SEM⁺) (Figura 28).

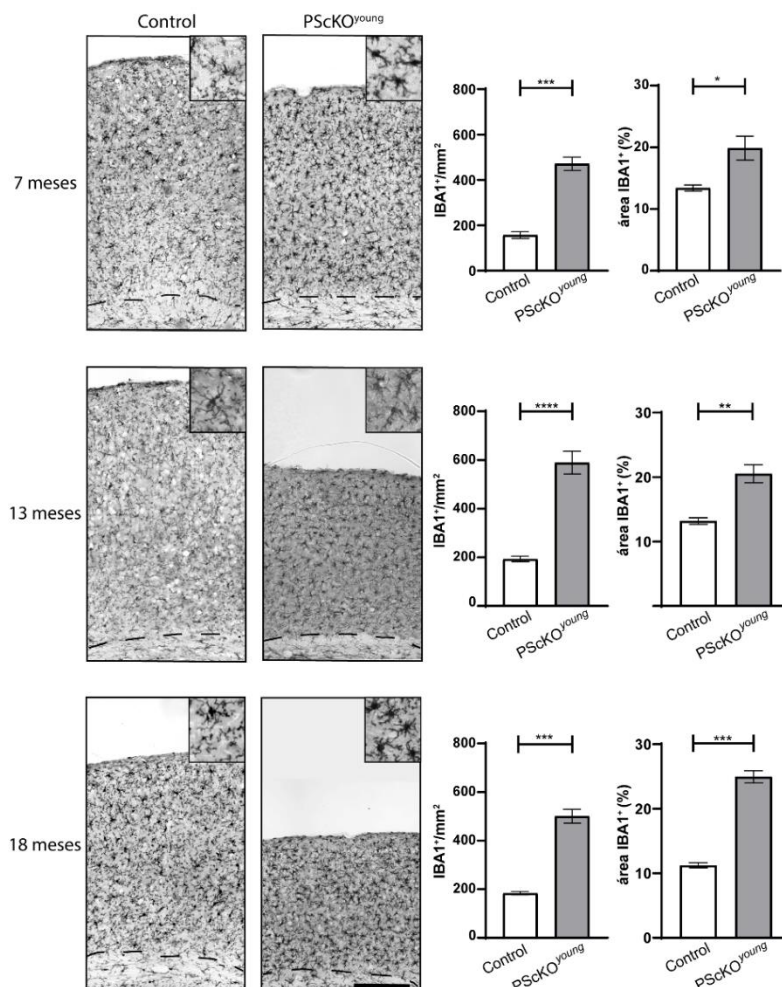


Figura 28. Presencia de microglía cortical en animales PScKO^{young}. A la izquierda, imágenes representativas de secciones de corteza de animales PScKO^{young} de 7, 13 y 18 meses teñidas con anti-Iba1. La barra de escala representa 200 μm, la línea discontinua delimita el cuerpo calloso. A la derecha, cuantificación de la densidad microglial y el porcentaje de área teñida por anti-Iba1. N a 7 meses= 3 controles, 3 PScKO^{young}; a 13 meses 5 controles, 5 PScKO^{young}; a 18 meses 3 controles, 3 PScKO^{young}; 4-5 cortes por animal. Análisis estadístico *t*-test. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. Las barras de error representan la SEM.

Cabe destacar que el incremento progresivo del porcentaje de área teñida por Iba1 vino acompañado de un notable cambio en la morfología de la microglía en los ratones PScKO^{young} respecto a la de animales controles, observándose unos somas más gruesos y ramificaciones más cortas y gruesas, indicando una mayor activación de esta (Figura 28).

A continuación, estudiamos la presencia de microglía en el hipocampo de animales PScKO^{young} de 7, 13 y 18 meses, en concreto, se llevó a cabo una cuantificación en la región CA3 del hipocampo. En el análisis del número de células Iba1⁺ por mm² encontramos un incremento de tres veces en los animales PScKO^{young} respecto a animales controles. Este incremento en el número de células Iba1⁺ se mantuvo a los 13 y 18 meses. (7 meses, control: 139.5 ± 13.99 , PScKO^{temp}: 449.2 ± 6.95 ; 13 meses, control: 200.6 ± 22.44 , PScKO^{young}: 567.0 ± 33.54 ; 18 meses, control: 142.5 ± 22.17 , PScKO^{young}: 488.6 ± 13.34 . Unidades: células Iba1⁺/mm² \pm SEM) (Figura 29). Este incremento en la densidad de células Iba1⁺ vino acompañado del mismo cambio en la morfología que el observado en la región cortical (Figura 29).

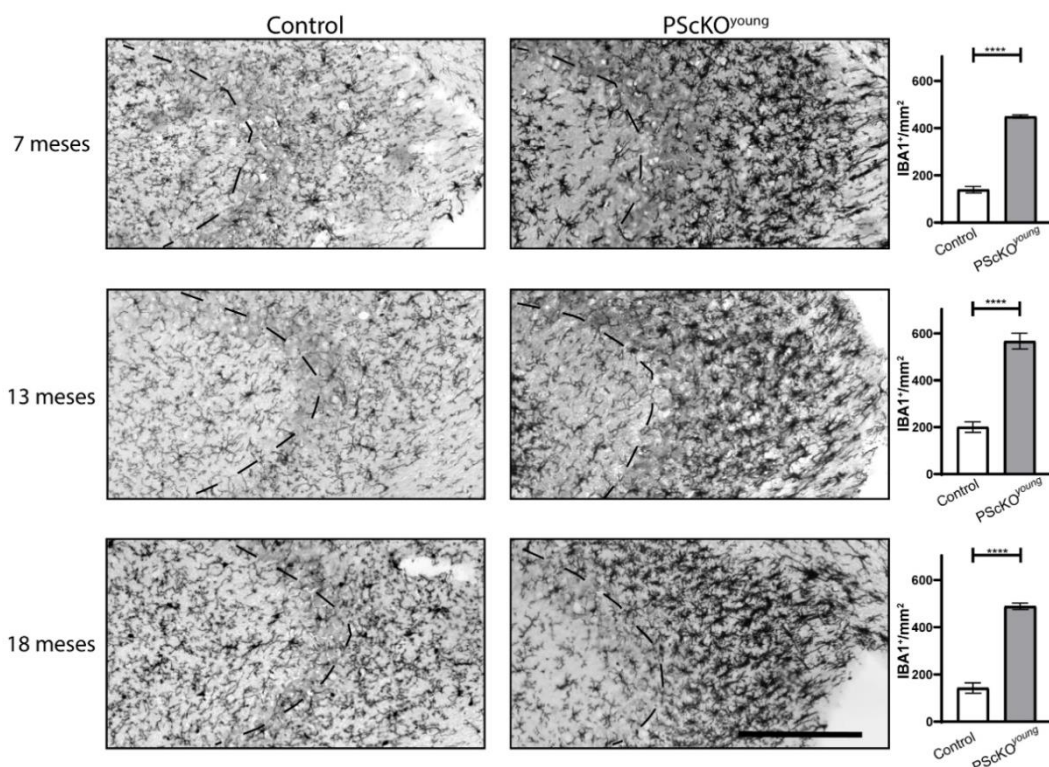


Figura 29. Presencia de microglía hipocampal en animales PScKO^{young}. A la izquierda, imágenes representativas de secciones de hipocampo de animales PScKO^{young} de 7, 13 y 18 meses teñidas con anti-Iba1. Se muestra la región CA3. La barra de escala representa 200 μ m, la línea discontinua indica la capa piramidal. A la derecha, cuantificación de la densidad microglial. N a 7 meses= 3 controles, 3 PScKO^{young}; a 13 meses 5 controles, 5 PScKO^{young}; a 18 meses 3 controles, 3 PScKO^{young}; 4-5 cortes por animal. Análisis estadístico *t-test*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan la SEM.

Estos resultados del análisis de la microglía en la corteza e hipocampo de animales PScKO^{young} son comparables a los obtenidos en estudios previos realizados en animales PScKO (Watanabe et al., 2014), donde los autores observaron un incremento en la densidad de células Iba1⁺ en animales PScKO de 4 y 3 veces en corteza e hipocampo, respectivamente, a la edad de 16 meses.

Neurodegeneración cortical		
Edad (meses)	PScKO	PScKO ^{young}
6-7	35% de pérdida de volumen cortical	16% de reducción en el grosor de corteza
9-13	35% de pérdida de volumen cortical	38% de reducción en el grosor de corteza
16-18	50% de pérdida de volumen cortical	34% de reducción en el grosor de corteza
Astrogliosis cortical (área GFAP ⁺)		
Edad (meses)	PScKO	PScKO ^{young}
6-7	No datos cuantitativos	Incremento de 1.7 veces
9-13	No datos cuantitativos	Incremento de 2.8 veces
16-18	Incremento de 7 veces	Incremento de 4.7 veces
Microgliosis cortical (densidad de Iba1 ⁺)		
Edad (meses)	PScKO	PScKO ^{young}
6-7	No datos cuantitativos	Incremento de 3 veces
9-13	No datos cuantitativos	Incremento de 3 veces
16-18	Incremento de 5 veces	Incremento de 2.7 veces

Tabla 8. Comparación de los datos histológicos entre animales PScKO y PScKO^{young}. Se describen los datos cuantitativos recopilados por otros grupos sobre la neurodegeneración, astrogliosis y microgliosis cortical en los animales PScKO en distintos rangos de edad. Se comparan con los datos obtenidos en los animales PScKO^{young}. Datos de los PScKO obtenidos de Saura et al., 2004; Watanabe et al., 2014; Wines-Samuels et al., 2010

En conjunto, la caracterización histológica realizada en los animales PScKO^{young} indica que la inducción de la escisión de *Psen1* en el primer mes de vida de los animales PScKO^{young} reproduce los defectos observados en neurodegeneración, astrogliosis y microgliosis en animales PScKO por otros grupos (Saura et al., 2004; Watanabe et al., 2014; Wines-Samuels et al., 2010) (Tabla 8). De esta manera, los resultados obtenidos

durante el abordaje experimental empleado indica que podemos considerar validado funcionalmente el modelo animal PScKO^{temp}.

2.2 Análisis del fenotipo asociado con neurodegeneración causado por la pérdida de función de PS en el cerebro envejecido

La caracterización del modelo PScKO^{young} nos llevó a las siguientes observaciones: i) la escisión de *Psen1* se puede regular con tamoxifeno, II) los fragmentos CTFs de diferentes sustratos de PS se acumulan ante la pérdida de función γ -secretasa y III) se produce una neurodegeneración, astrogliosis y microgliosis similares a las encontradas en los animales PScKO. Una vez validado el modelo experimental, decidimos provocar la pérdida de función de PS/ γ -secretasa a distintas edades del envejecimiento: 7 meses (ratones PScKO^{adult}) y 13 meses (ratones PScKO^{old}). Para cada caso, el efecto de la pérdida de función de PS/ γ -secretasa se planteó estudiar en segmentos de 6 meses tras la escisión, permitiendo así la comparación entre modelos. De esta forma, buscamos analizar si los efectos provocados por la pérdida de función de PS se ven alterados por la edad del cerebro donde ocurren. En la figura 30 se representa el esquema general de la aproximación empleada.

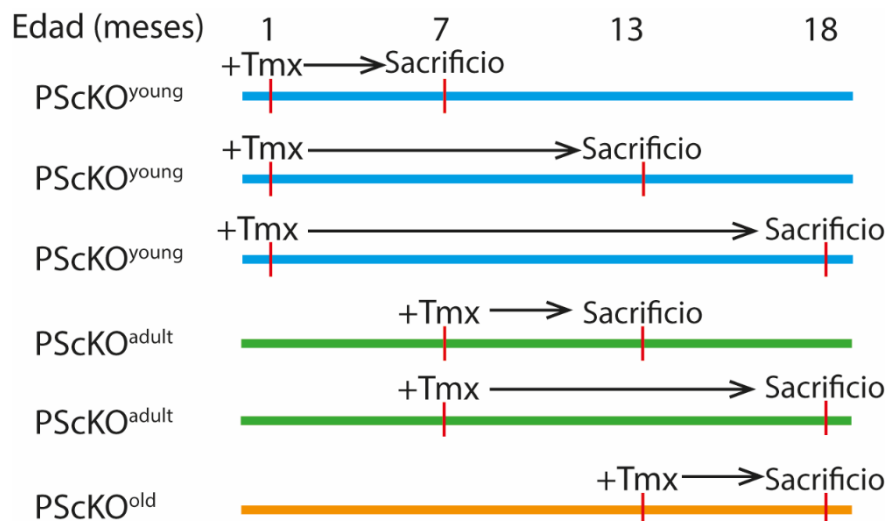


Figura 30 Representación del esquema de tratamiento con tamoxifeno (Tmx). Se muestra el tratamiento con tamoxifeno a 1 mes en los animales PScKO^{temp} y las distintas edades a las que se ha realizado el estudio de neurodegeneración y marcadores asociados, detallado en los puntos anteriores de esta tesis doctoral. Abajo en verde, el esquema de tratamiento para conseguir la escisión de *Psen1* en la edad adulta del animal con los dos puntos propuestos para su realización.

En un primer conjunto de experimentos planteamos estudiar los efectos en neurodegeneración, astrogliosis y microgliosis en animales con pérdida de función de PS en el cerebro envejecido. Las exigencias temporales de los modelos desarrollados, junto con las limitaciones de tiempo de la Tesis Doctoral, han hecho que en el momento de escritura de esta memoria solo se encontraran completados datos de ratones PScKO^{adult} de 13 meses. Estos datos se presentarán a continuación y se compararán con los datos obtenidos en los ratones PscKO^{young} de 7 meses, presentados en apartados previos.

2.2.1 Neurodegeneración en animales PScKO^{adult}

De forma similar al estudio realizado en animales PScKO^{young}, analizamos la neurodegeneración en los animales PScKO^{adult} mediante tinciones de cortes cerebrales empleando el anticuerpo anti-NeuN. Se realizaron mediciones de grosor de corteza desde la capa II a la capa VI y la cuantificación de la densidad de células NeuN⁺.

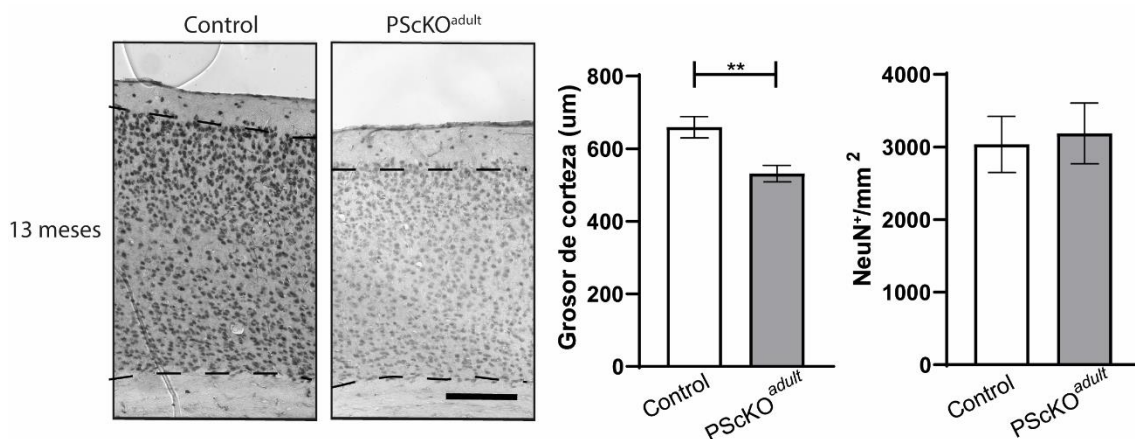


Figura 31. Neurodegeneración en animales PScKO^{adult}. Imágenes representativas de secciones de corteza de animales PScKO^{adult} de 13 meses teñidas con NeuN. La barra de escala representa 200 μm , la línea discontinua delimita el final de la capa I y el inicio del cuerpo caloso. A la derecha, cuantificación del grosor de corteza y densidad de células NeuN⁺. N= 5 controles, 5 PScKO^{temp-7m} de 13 meses, 5 cortes por animal.

Los ratones PScKO^{adult} de 13 meses presentaron una reducción del grosor de la corteza del 20% respecto a animales controles (Control: 659.2 ± 29.46 , PScKO^{adult}: 531.1 ± 22.76 . Unidades: $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) (Figura 31). La reducción del grosor de corteza observada previamente en los animales PScKO^{young} en el periodo de 1 a 7 meses fue del 16%. Sin embargo, la reducción del grosor de corteza en los animales PScKO^{young} a los 13 meses fue del 38%, es decir, una reducción de 22% en el segmento de 7 a 13 meses. Por tanto, la reducción del grosor de corteza en los ratones PScKO^{adult} fue ligeramente superior a la observada en los animales PScKO^{young} tras el mismo tiempo de escisión de 6 meses

(PScKO^{young} 16% vs PScKO^{adult} 20%), pero más cercana a la reducción correspondiente al mismo tramo de edad (PScKO^{young} 7-13 meses, 22% vs PScKO^{adult} 7-13 meses, 20%). Si bien estos resultados son muy iniciales, podrían sugerir la existencia de edades durante el envejecimiento de mayor susceptibilidad a la pérdida de PS/ γ -secretasa.

Por otro lado, no se observaron diferencias en la densidad de células NeuN⁺ entre animales controles y PScKO^{adult} (Control: 3037 ± 385.9 , PScKO^{adult}: 3187 ± 417.2 . Unidades: Células NeuN⁺/mm²) (Figura 31).

2.2.2 Astrogliosis en los animales PScKO^{adult}

Realizamos inmunotinciones empleando el anticuerpo anti-GFAP para analizar la presencia de astrocitos en los cerebros de los animales PScKO^{adult}. En el análisis de la tinción de GFAP encontramos un incremento del área teñida en los animales PScKO^{adult} de dos veces la encontrada en los controles (Control: 9.60 ± 2.02 , PScKO^{adult}: 20.29 ± 2.76 . Unidades: porcentaje de área GFAP⁺ \pm SEM) (Figura 32). El incremento observado es ligeramente mayor que el analizado previamente en los animales PScKO^{young} de 7 meses de edad, con el mismo periodo de escisión de *Psen1* (1.7 veces).

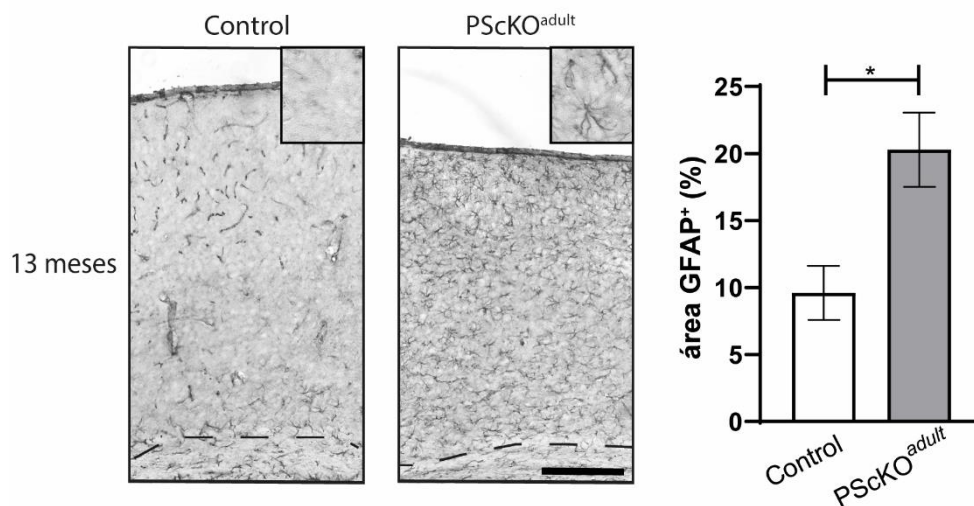


Figura 32. Astrogliosis en animales PScKO^{adult}. Imágenes representativas de secciones de corteza de animales PScKO^{adult} de 13 meses teñidas con anti-GFAP. La barra de escala representa 200 μ m, la línea discontinua delimita el cuerpo calloso. A la derecha, cuantificación del porcentaje de área teñida por anti-GFAP. N= 5 controles, 5 PScKO^{adult}, 5 cortes por animal.

2.2.3 Microgliosis en animales PScKO^{adult}

Para analizar la microglía en la corteza de los animales PScKO^{adult} empleamos cortes coronales de corteza y realizamos experimentos de inmunohistoquímica con el

anticuerpo Iba1. La densidad de células Iba1⁺ de los animales PScKO^{adult} fue de 2 veces la observada en los animales controles (Control: 207.8 ± 31.71 , PScKO^{temp-7m}: 451.0 ± 45.30 . Unidades: células Iba1⁺/mm² \pm SEM) (Figura 33).

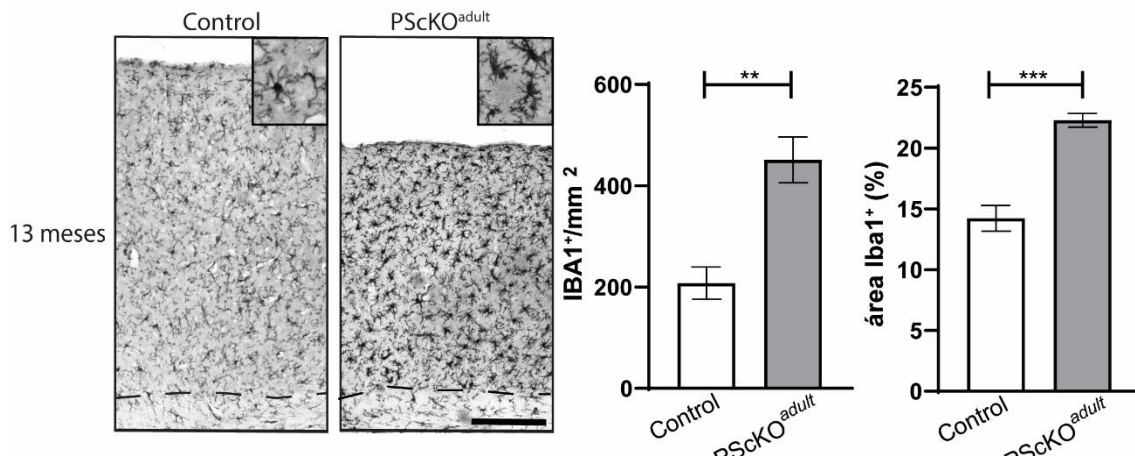


Figura 33 Microgliosis en animales PScKO^{adult}. Imágenes representativas de secciones de corteza de animales PScKO^{adult} de 13 meses teñidas con anti-Iba1. La barra de escala representa 200 μ m, la línea discontinua delimita el cuerpo caloso. A la derecha, cuantificación del porcentaje de área teñida y de la densidad microglial. N= 5 controles, 5 PScKO^{adult}, 5 cortes por animal.

En cuanto al área teñida encontramos un incremento de 1.5 veces en los animales PScKO^{adult} respecto a animales controles (Control: 14.23 ± 1.06 , PScKO^{adult}: 22.28 ± 0.56 . Unidades: porcentaje de área Iba1⁺ \pm SEM) (Figura 33). Este incremento en la densidad de las células Iba1⁺ vino acompañado de un cambio en la morfología, con unos somas más grandes y unas prolongaciones más cortas y gruesas (Figura 33). Los datos de densidad y superficie ocupada por Iba1 en los animales PScKO^{adult} fueron ligeramente menores y mayores, respectivamente, a los encontrados en los ratones PScKO^{young} a la edad de 7 meses.

Neurodegeneración cortical (grosor de corteza)		
Tiempo de escisión	PScKO ^{young}	PScKO ^{adult}
6 meses	16% de reducción	20% de reducción
Astrogliosis cortical (área GFAP ⁺)		
Tiempo de escisión	PScKO ^{young}	PScKO ^{adult}
6 meses	Incremento de 1.7 veces	Incremento de 2.11 veces
Microgliosis cortical (densidad de Iba1 ⁺)		
Tiempo de escisión	PScKO ^{young}	PScKO ^{adult}
6 meses	Incremento de 3 veces	Incremento de 2.17 veces

Tabla 9. Comparación de los datos histológicos obtenidos en animales PScKO^{young} y PScKO^{adult} tras 6 meses de escisión de *Psen1*. Se muestran los datos de neurodegeneración, astrogliosis y microgliosis corticales obtenidos comparando los animales PScKO^{young} de 7 meses con los animales PScKO^{adult} de 13 meses.

El conjunto de estos datos indicó que la escisión de *Psen1* en la edad adulta del animal (7 meses) produce neurodegeneración, astrogliosis y microgliosis. Además, los datos de pérdida de grosor de corteza y de astrogliosis apuntan a una mayor sensibilidad del cerebro adulto a la pérdida de función de PS (Tabla 9), datos que necesitan confirmación experimental en futuros experimentos.

3 Efecto del incremento específico de los niveles de NrxnCTF en el contexto de pérdida de función de Presenilina

La falta de función de PS conlleva el acúmulo de los diversos CTFs de sus sustratos. Dado el elevado número de sustratos, unos 150 identificados hasta día de hoy, se desconoce si alguno de ellos tiene especial relevancia en el desarrollo sintomático de AD. Resultados previos del grupo identificaron a Nrxns como sustrato de PS (Saura et al., 2011), además, demostraron que el acúmulo de NrxnCTF en cultivos neuronales inhibe la probabilidad de liberación, mimetizando los efectos provocados por una pérdida de función de PS (Servián-Morilla et al., 2018). Más recientemente, hemos demostrado que el acúmulo selectivo de NrxnCTF en el cerebro del ratón adulto produce defectos de memoria asociativa y de plasticidad presináptica en la amígdala (Sánchez-Hidalgo et al., 2022). Estos datos demuestran que la acumulación sináptica de NrxnCTF puede provocar, por sí misma, defectos de plasticidad sináptica y de memoria típicos de una falta de función de PS en AD. Si bien el desarrollo de estos modelos nos ha permitido demostrar un papel específico de la falta de procesamiento de NrxnCTF en la pérdida de función de PS, las mutaciones de pérdida de función de *PSEN1* provocan la acumulación de sus numerosos sustratos, no solo de NrxnCTF. Es decir, los efectos deletéreos provocados por la acumulación de NrxnCTF se podrían ver alterados al alza o modificados provocando nuevos defectos cuando la acumulación de NrxnCTF se acompaña de la acumulación del resto de sustratos de PS. Esta es una pregunta fundamental que requiere para su respuesta alterar los niveles de la acumulación de NrxnCTF en un contexto de pérdida de función de PS. Para ello, en el grupo hemos generado un nuevo modelo animal, los ratones PScKO;NrxnCTF ($PS1^{f/f}; PS2^{-/-}; CaMKII-CreERT2; CaMKII-HA-NrxnCTF$) (Figura 34).

En estos animales se combina la falta de función de PS gracias a la escisión de *Psen1* inducida por tamoxifeno en un fondo KO *Psen2* con la expresión del transgén HA-NrxnCTF en las neuronas glutamatérgicas del cerebro adulto (Figura 34). La etiqueta HA en el transgén permite detectar la expresión NrxnCTF y diferenciarla de la acumulación de NrxnCTF endógeno. Como controles se emplearon animales PScKO^{young} y PS1^{f/f}; PS2^{-/-}; CaMKII-HA-NrxnCTF para analizar el acúmulo basal de NrxnCTF endógeno y la expresión basal del transgén HA-NrxnCTF respectivamente.

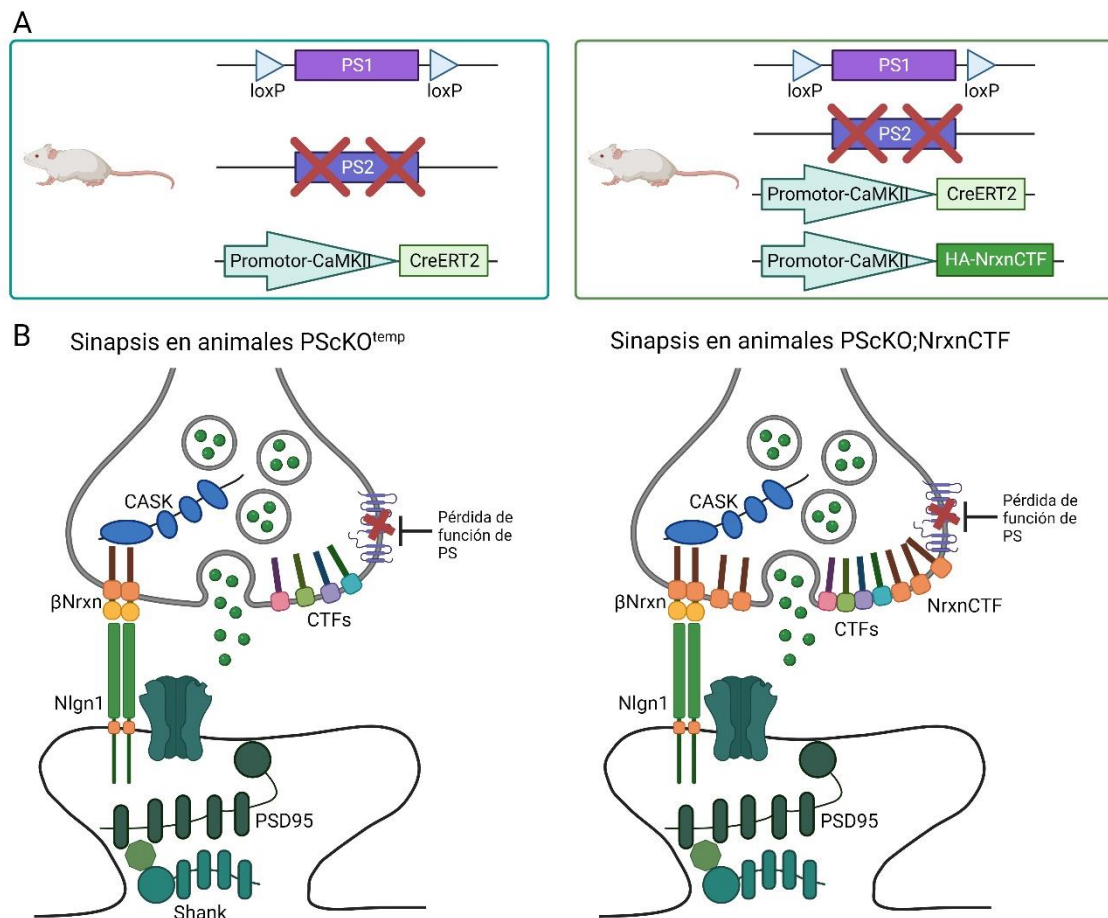


Figura 34. Comparación de los modelos animales PScKO^{temp} y PScKO;NrxnCTF. A.- Genotipo de los ratones PScKO^{temp} y PScKO;NrxnCTF. B.- Representación de las sinapsis en ambos modelos. A la izquierda, en el modelo animal PScKO^{temp}, la pérdida de función de PS produce el acúmulo de diversos CTFs, a la derecha, en el modelo animal PScKO;NrxnCTF, se combina la pérdida de función de PS, con el consecuente acúmulo de diferentes CTFs, con la expresión exógena de NrxnCTF. Esquema generado con biorender.com

3.1.1 Análisis de expresión de NrxnCTF en los animales PScKO;NrxnCTF

El objetivo de los ratones PScKO; NrxnCTF es incrementar específicamente los niveles de NrxnCTF en las neuronas glutamatérgicas del prosencéfalo adulto, mientras que se mantienen los niveles de acúmulo de todos los demás sustratos CTFs de PS en las

mismas neuronas. Para comprobar la validez de la estrategia experimental analizamos la expresión de NrnxCTF de los animales PScKO; NrnxCTF tratados con tamoxifeno a 1 mes y los comparamos con varios tipos de controles. Como control negativo, empleamos dos tipos de ratones con función normal de PS1 y que, por tanto, no acumulan sustratos de PS: animales PS1^{ff/ff}; PS2^{-/-} (denominados ratones controles) y ratones PS1^{ff/ff}; PS2^{-/-}; CaMKII-HA-NrxnCTF para analizar la expresión basal del transgén HA-NrxnCTF (denominados ratones CaMKII-HA-NrxnCTF). Como control positivo de acumulación de sustratos PS/ γ -secretasa empleamos animales PScKO^{young}, en los que el acúmulo de los diferentes sustratos de PS, incluido NrnxCTF, ocurre de manera similar que en los ratones PScKO. Experimentos de *Western blot* empleando el anticuerpo anti-HA revelaron que la expresión basal del transgén HA-NrxnCTF fue indetectable tanto en el hipocampo como en la corteza de animales CaMKII-HA-NrxnCTF (Figura 35). Sin embargo, la expresión de HA-NrxnCTF sí se detectó claramente en ambas estructuras cerebrales en los animales PScKO; NrnxCTF presumiblemente debido a la falta de función de PS (Figura 35). Estos resultados confirman que HA-NrxnCTF se procesa proteolíticamente por PS in vivo y que la falta de función PS/ γ -secretasa lleva a su acumulación.

Para analizar el nivel de sobreexpresión de NrnxCTF, comparamos el acúmulo del transgén HA-NrxnCTF con el acúmulo endógeno de NrnxCTF en los animales PScKO^{young}. Para ello, empleamos un anticuerpo que reconoce el fragmento C-terminal común de Nrnxns (anticuerpo Pan-Nrxn). El anticuerpo Pan-Nrxn reveló el acúmulo endógeno de NrnxCTF que se produce en los animales PScKO^{young} por la falta de función de PS. Debido a la expresión del transgén HA-NrxnCTF, el acúmulo observado en los animales PScKO; NrnxCTF se vio incrementado, tanto en el hipocampo como en la corteza (Figura 35). La detección de NrnxCTF endógena en los PScKO^{young} se observó como una doble banda, al igual que la detectada en los animales PScKO empleando anticuerpos contra el dominio citoplásmico (Saura et al., 2011). Sin embargo, la detección del transgén NrnxCTF mostró una única banda revelada por el anticuerpo anti-HA. Estos resultados demuestran que la combinación de la expresión del transgén HA-NrxnCTF con la falta de función de PS genera un incremento en los niveles de NrnxCTF respecto al acúmulo basal observado en los animales PScKO^{young}.

Para estudiar si la expresión del transgén HA-NrxnCTF alteraba el acúmulo de los fragmentos CTFs de otros sustratos de PS, empleamos anticuerpos para detectar N-Cadherina y APP en su dominio citoplásmico. Pudimos observar que los niveles de las proteínas maduras y los niveles de sus correspondientes fragmentos CTFs fueron de magnitud similar en los animales PScKO^{young} y los ratones PScKO;NrxnCTF. El conjunto de estos datos demostró que la sobreexpresión y el acúmulo específico de NrxnCTF no interfiere con el acúmulo general de los fragmentos CTFs de los sustratos de PS en los animales PScKO^{young}.

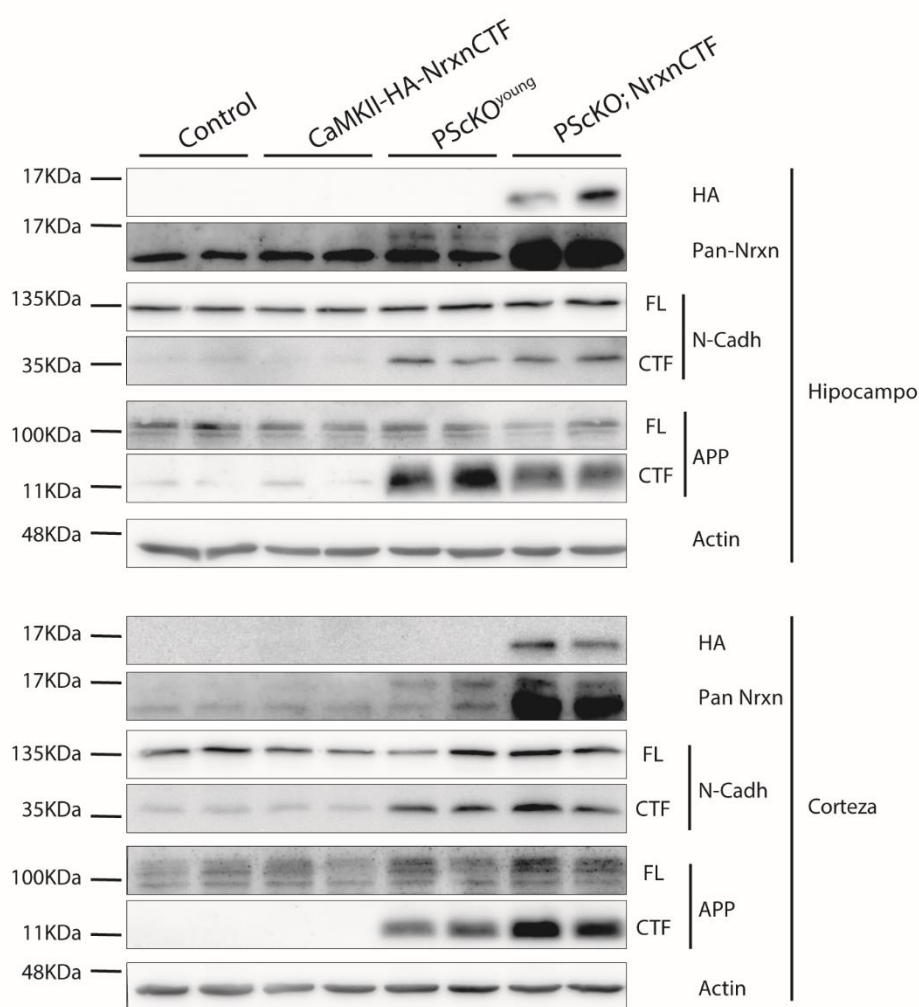


Figura 35. Análisis de expresión de proteínas en el modelo PScKO;NrxnCTF. Western blot de lisados provenientes de hipocampo y corteza de animales controles, CaMKII-HA-NrxnCTF, PScKO^{young} y PScKO;NrxnCTF de 13 meses de edad. Análisis de expresión del transgén HA-NrxnCTF empleando el anticuerpo anti-HA, además del acúmulo de CTFs de distintos sustratos de PS.

3.1.2 Análisis histológico de la expresión de NrnxCTF en animales PScKO;NrnxCTF

Como parte de la caracterización del ratón PScKO;NrnxCTF decidimos estudiar el patrón de expresión del transgén HA-NrnxCTF en cortes de cerebro. Como controles negativos empleamos animales CaMKII-HA-NrnxCTF y animales PScKO^{young}.

En experimentos de inmunohistoquímica en cortes coronales de cerebro provenientes de animales de 13 meses, la tinción con el anticuerpo anti-HA no reconoció ninguna estructura evidente en los ratones PScKO^{young} ni en los animales CaMKII-HA-NrnxCTF (Figura 36). Sin embargo, en el caso de los animales PScKO;NrnxCTF se observó una tinción en corteza y especialmente intensa en el hipocampo (Figura 36). En el hipocampo, la tinción mostró un aspecto de fibras con origen en el giro dentado que se concentraban en la región CA3, compatible con la acumulación de NrnxCTF en el *stratum lucidum*. Estos resultados indican que la expresión de NrnxCTF transgénica tiene lugar en axones y terminaciones presinápticas, recapitulando la acumulación de NrnxCTF en ratones PScKO (Saura et al., 2011).

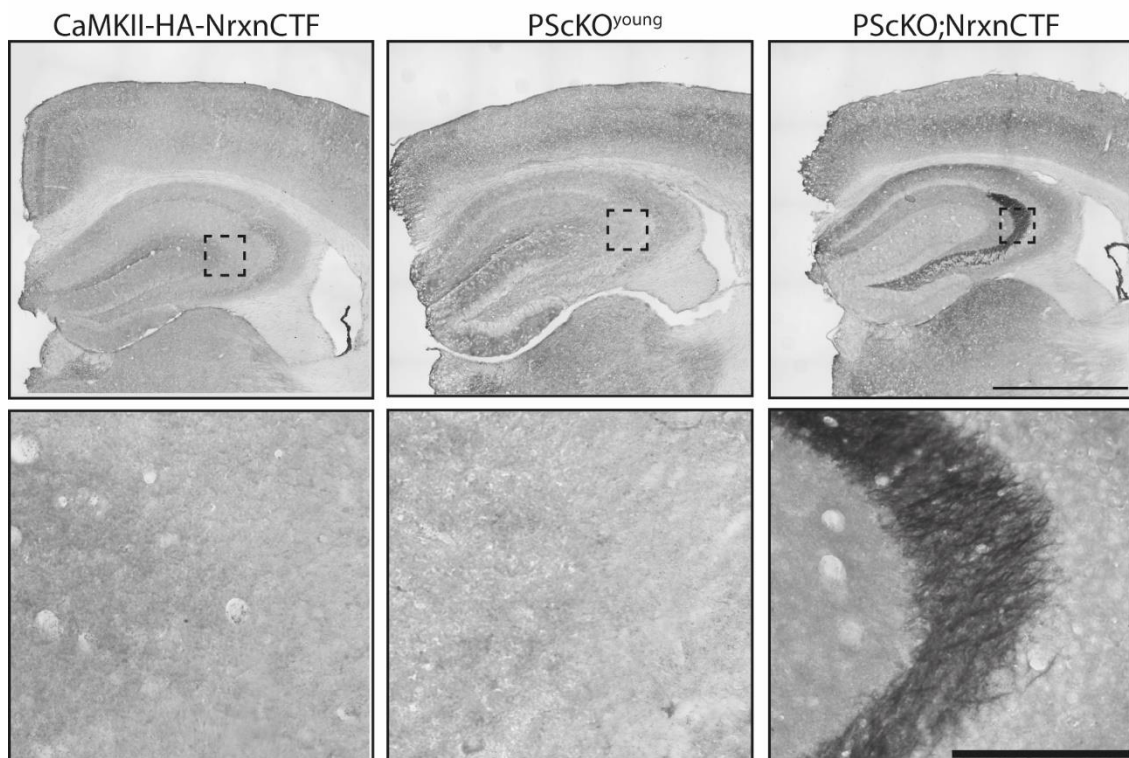


Figura 36. Expresión de HA-NrnxCTF en un contexto de falta de función de PS. Arriba, se muestran imágenes representativas de corteza e hipocampo con tinción anti-HA. Abajo, detalle de la región CA3 del hipocampo marcada en las imágenes superiores. Las barras de escala representan 1 mm arriba y 200 μ m abajo.

En conjunto, la caracterización realizada hasta ahora del ratón PScKO;NrnxCTF demuestra que hemos conseguido incrementar específicamente los niveles de acúmulo de NrnxCTF siguiendo el mismo patrón celular producido por una pérdida de función de PS, pero sin afectar el acúmulo de otros sustratos de PS.

Una vez validado el modelo animal, decidimos analizar si la neurodegeneración, astrocitosis y astrogliosis provocadas por una pérdida de función de PS se veían afectadas por el aumento específico de NrnxCTF. Para ello, realizamos inmunotinciones empleando los anticuerpos anti-NeuN, anti-GFAP y anti-Iba1 para analizar el grosor de corteza y la densidad neuronal, la astrocitosis y la astrogliosis, respectivamente, en animales PScKO;NrnxCTF de 13 meses de edad. Los resultados se compararon con los observados en los animales controles y PScKO^{young} a 13 meses de edad obtenidos en los experimentos previos.

En el estudio del grosor de corteza encontramos que los animales PScKO;NrnxCTF mostraron un descenso del 30% respecto a los animales controles, siendo este descenso similar al observado previamente en los animales PScKO^{young} (Control: 722.8 ± 34.64 , PScKO^{young}: 449.0 ± 23.54 , PScKO;NrnxCTF: 501.1 ± 29.58 . Unidades: $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) (Figura 37). Sin embargo, la sobreexpresión de NrnxCTF pareció tener un ligero impacto en la densidad neuronal. Observamos una reducción no significativa en la densidad de células NeuN⁺ en los animales PScKO;NrnxCTF respecto a los animales PScKO^{young} y controles (Control: 3418 ± 262.6 , PScKO^{young}: 3563 ± 228.3 , PScKO;NrnxCTF: 3119 ± 152.9 . Unidades: $\text{NeuN}^+/\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$) (Figura 37).

En cuanto al análisis de astrocitosis en corteza, analizamos la tinción con GFAP y cuantificamos el porcentaje de área teñida. Encontramos en los animales PScKO;NrnxCTF un incremento en el área teñida por GFAP de tres veces respecto a los animales controles, siendo estos niveles muy similares a los encontrados en los animales PScKO^{young} de la misma edad (Control: 7.40 ± 0.94 , PScKO^{young}: 20.76 ± 2.16 , PScKO;NrnxCTF: 22.08 ± 1.49 . Unidades: porcentaje de área teñida por GFAP $\pm \text{SEM}$) (Figura 37). Para el análisis de la microglía empleamos tinciones con Iba1 y cuantificamos tanto el porcentaje de área teñida como la densidad de células Iba1⁺. En los animales PScKO;NrnxCTF el incremento en el porcentaje de área cortical teñida con Iba1 fue de 1.7 veces, muy similar al encontrado en los animales PScKO^{young} (Control: 13.20 ± 0.51 , PScKO^{young}: 20.51 ± 1.39 , PScKO;NrnxCTF: 23.54 ± 2.82 , Unidades: porcentaje de área teñida por Iba1 \pm

SEM) (Figura 37). De igual forma, el incremento observado en la densidad de células Iba1⁺ en la corteza de los animales PScKO;NrnxCTF fue de tres veces respecto a animales controles, muy similar al encontrado en los PScKO^{young} (Control: 193.4 ± 11.47 , PScKO^{young}: 589.7 ± 46.83 , PScKO;NrnxCTF: 576.9 ± 29.75 . Unidades: Iba1⁺/mm² \pm SEM) (Figura 37). Estos datos indican que el incremento de NrnxCTF no tiene un impacto en la astrogliosis ni en la microgliosis presente en los animales PScKO^{young}, al menos a esta edad tardía seleccionada.

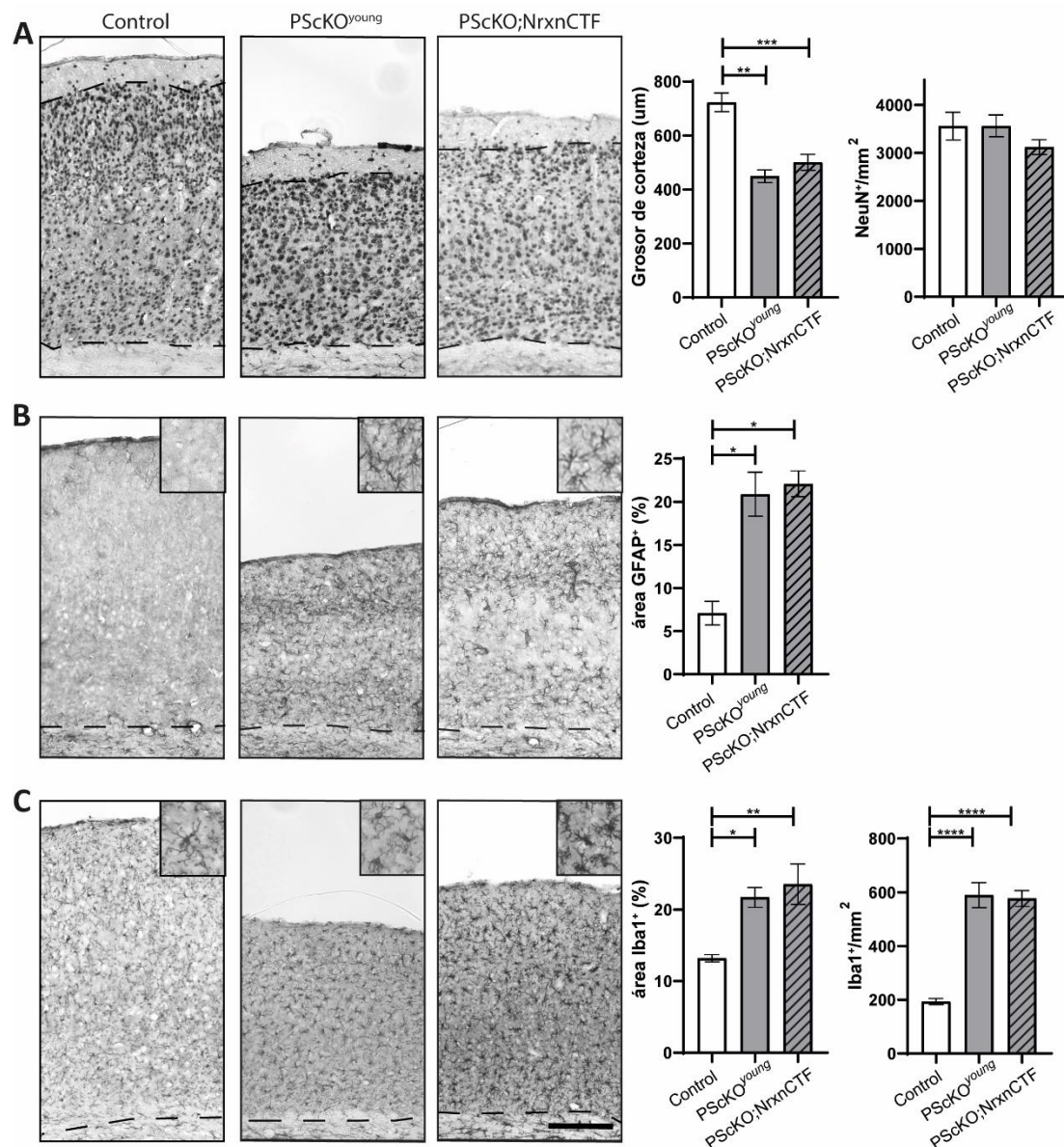


Figura 37. Neurodegeneración, microgliosis y astrogliosis en el modelo PScKO;NrnxCTF. A, B, C.- A la izquierda, imágenes representativas de secciones de corteza de animales controles, PScKO^{young} y PScKO;NrnxCTF de 13 meses teñidas con anti-NeuN, anti-GFAP y anti-Iba1 respectivamente. A la derecha, cuantificación del grosor de corteza y densidad de células NeuN⁺ (A), del porcentaje de área teñida por GFAP (B) y del porcentaje de área teñida por Iba1 y de la densidad de microglía (C). N= 5 controles, 5 PScKO^{young}, 4 PScKO;NrnxCTF. La barra de escala representa 200 μm, la línea discontinua delimita el cuerpo calloso. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

En conjunto, estos datos sugieren que el incremento en el acúmulo de NrxnCTF en un contexto de pérdida de función de PS no afecta de forma general al acúmulo de otros sustratos de PS/ γ -secretasa. En cuanto a la contribución a los defectos ya observados en los animales PScKO^{young}, hemos obtenido alguna evidencia de un ligero impacto sobre la densidad neuronal, siendo el grosor de corteza, la astrogliosis y la microgliosis de magnitudes muy similares a las encontradas en los animales PScKO^{young}. La generación de este modelo animal nos permitirá, en un futuro, analizar los efectos sobre la neurodegeneración del incremento de NrxnCTF a edades más jóvenes y en otros aspectos funcionales donde el efecto de NrxnCTF ya ha sido documentado, como memoria y función sináptica (Sánchez-Hidalgo et al., 2022; Servián-Morilla et al., 2018).

4 Caracterización bioquímica y conductual del modelo animal knockin *Nlgn1* Thr271fs

El modelo animal KI *Nlgn1* Thr271fs se generó en nuestro laboratorio empleando tecnología TALENS para introducir una inserción de TT encontrada en una paciente con AD en el gen *Nlgn1* del ratón (Tristán-Clavijo et al., 2015). Con el objetivo de analizar los efectos de esta mutación en el animal y su posible relación con AD, se ha realizado una caracterización bioquímica y comportamental del animal KI *Nlgn1* Thr271fs.

4.1 Generación del modelo animal knockin *Nlgn1* Thr271fs y caracterización de la expresión de Neuroliquina 1

La región afectada por la mutación *Nlgn1* Thr271fs está conservada en el genoma del humano y ratón (Figura 38). El ADN donador contenía las dos TT a insertar además de una mutación silente para generar una diana de restricción *HpaI* con la finalidad de facilitar la detección del alelo mutante. Mediante PCR de ADN genómico seguido de una restricción con *HpaI* se identificaron 3 potenciales fundadores entre 20 ratones nacidos. Se confirmó la presencia del alelo mutante *Nlgn1* Thr271fs en heterocigosis en dos de los tres candidatos empleando secuenciación Sanger. El tercer candidato se descartó tras comprobar que contenía una delección adicional en el segundo alelo de *Nlgn1*.

El cruce de los dos fundadores con animales C57BL/6J silvestres mostró una descendencia con una herencia del alelo *Nlgn1* Thr271fs en una frecuencia esperada del 50%. Se descartaron inserciones *off-target* del ADN donador empleando qPCR genómica en la descendencia de las dos líneas de animales KI *Nlgn1* Thr271fs. Seleccionamos una de las dos líneas idénticas del ratón KI *Nlgn1* Thr271fs con la que se realizaron el resto de los experimentos.

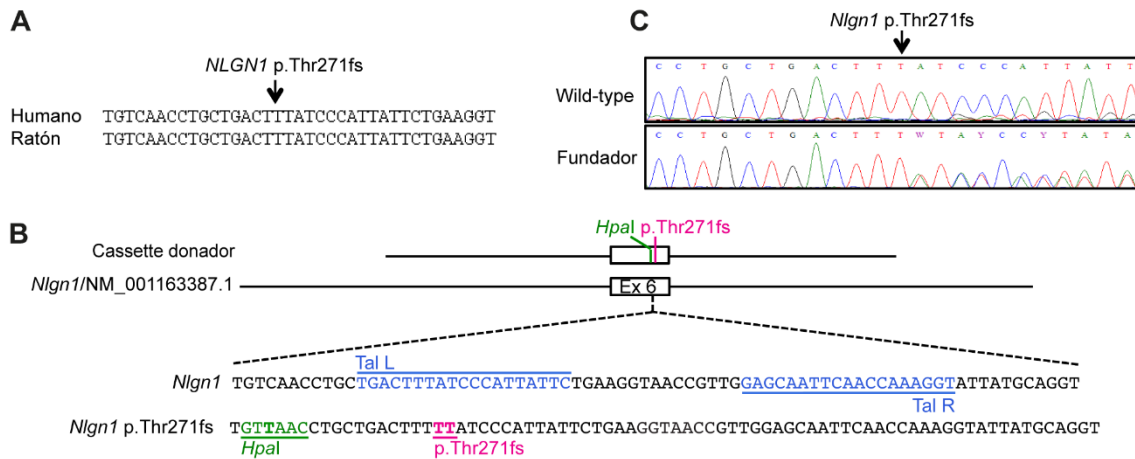


Figura 38. Generación del modelo animal *Nlgn1* Thr271fs. A.- Secuencia conservada del gen *NLGN1* humano y de ratón. B.- Esquema representativo de la estrategia *knockin*. Se indican la inserción de TT y de la diana *HpaI* en el ADN donador. C.- Comparación de la secuencia de nucleótidos de la mutación *Nlgn1* Thr271fs junto con el alelo *wild type*.

Para analizar la expresión del alelo *Nlgn1* Thr271fs se realizaron experimentos de RT-PCR seguidos de una digestión con *HpaI* empleando material de diferentes regiones del cerebro. En animales silvestres se observó una única banda resistente a la restricción de *HpaI*, tal como se espera de la expresión del alelo sin editar silvestre de *Nlgn1* (Figura 39). En animales *Nlgn1* Thr271fs heterocigotos (HTZ) se observó una banda control resistente a la restricción de *HpaI* junto con dos bandas de los pesos esperados resultantes de la restricción con *HpaI*. La suma de las bandas provenientes del alelo mutante mostró una menor intensidad que la banda correspondiente a la expresión del alelo silvestre (Figura 39). Esto parece indicar que el ARN mensajero transcrito por el alelo *Nlgn1* Thr271fs es inestable y mayoritariamente degradado, presumiblemente, por un mecanismo de *nonsense-mediated mRNA decay*.

Para analizar en más detalle la expresión del alelo *Nlgn1* Thr271fs decidimos realizar experimentos de *Western blot*. Se analizaron lisados provenientes de dos regiones cerebrales distintas, corteza e hipocampo, en animales de 6 meses de edad. *Nlgn1* se detectó empleando un anticuerpo que reconoce a la proteína en su extremo N-

terminal. Esta región se esperaba presente en la proteína truncada resultante del alelo mutante *Nlgn1* Thr271fs, ya que la mutación Thr271fs genera un codón de parada prematuro en la posición 284 y 293 para las isoformas *Nlgn1* (-B) y *Nlgn1* (+B) respectivamente (Tristán-Clavijo et al., 2015). Se detectó una reducción al 50% de la proteína *Nlgn1* madura en animales heterocigotos *Nlgn1* Thr271fs (HTZ) mientras que en animales homocigotos *Nlgn1* Thr271fs (HMZ) se observó una ausencia de la banda correspondiente a la proteína madura *Nlgn1* (Figura 39). Sin embargo, el fragmento truncado de *Nlgn1* de alrededor de 30 KDa solo se pudo detectar en el caso de *blots* sobre expuestos de animales HTZ y HMZ Thr271fs. La cuantificación de esta banda indicó una expresión menor al 1% respecto a la proteína silvestre presente en los mismos animales HTZ Thr271fs. Esta estimación está presumiblemente sobreestimando los niveles del fragmento debido a la sobreexposición de los *blots*.

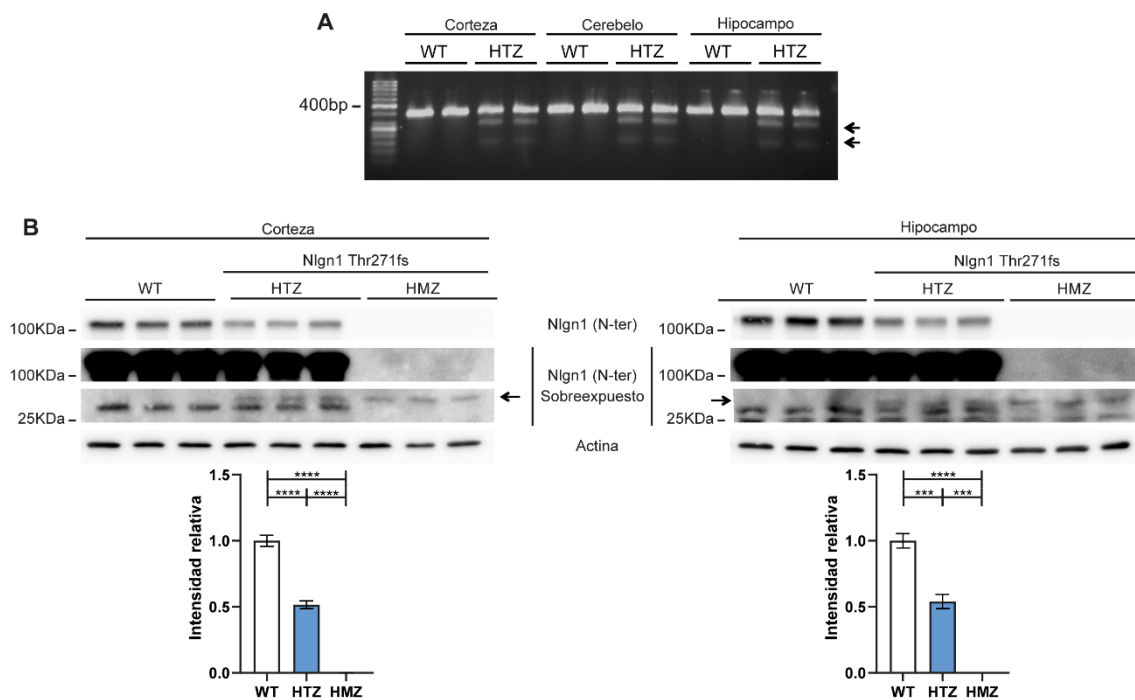


Figura 39. Expresión del alelo mutante *Nlgn1* Thr271fs. A.- Experimento de RT-PCR de diferentes regiones cerebrales de animales *wild type* y HTZ *Nlgn1* Thr271fs. La incubación con la encima de restricción *HpaI* genera una banda resistesten en el alelo *wild type* y dos bandas digeridas en el alelo *Nlgn1* Thr271fs (indicadas con dos flechas). B.- Western blot de lisados provenientes de corteza e hipocampo de animales *wild type*, HTZ y HMZ Thr271fs. Se observa la ausencia de *Nlgn1* madura en animales HMZ y una reducción al 50% en animales HTZ. Se puede observar una cantidad marginal del fragmento N-terminal de *Nlgn1* en el caso de *blots* sobreexpuestos. Se empleó un anticuerpo de *Nlgn1* que reconoce un epítipo N-terminal. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan la SEM.

Estos resultados indican que la mutación *Nlgn1* Thr271fs asociada con AD genera un alelo nulo junto con una cantidad marginal del fragmento correspondiente a la proteína *Nlgn1* truncada.

4.2 Caracterización conductual de los animales *knockin* Nlgn1 Thr271fs

4.2.1 Evaluación general del estado del animal

Se realizó una primera evaluación del estado general del animal. No se detectaron diferencias observables en el aspecto general en los animales Nlgn1 Thr271fs respecto a sus hermanos de camada *wild type*. Además, no se observaron cambios en la frecuencia mendeliana esperada de nacimientos ni en animales HTZ ni HMZ Nlgn1 Thr271fs. Tampoco se observaron diferencias en peso o en esperanza de vida respecto a hermanos de camada (datos no mostrados).

Por otro lado, para evaluar las funciones sensoriales autónomas y musculares de los animales Nlgn1 Thr271fs se realizó el conjunto de pruebas primarias SHIRPA (Rogers et al., 1997) detallados en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos (Tabla 5). Tras analizar la posición corporal, los reflejos de enderezamiento, postural y faciales, la fuerza en las extremidades y la visión y audición de los animales, no se detectó ningún defecto funcional en animales Nlgn1 Thr271fs o en animales *wild type*. Las pruebas de análisis primarias SHIRPA se repitieron previamente a cada conjunto de pruebas conductuales para asegurar la ausencia de problemas que pudieran causar alguna dificultad a la hora de su realización y verificar el estado general de cada población.

4.2.2 Análisis fenotípico de una población adulta de animales *knockin* Nlgn1 Thr271fs

Parte central del diagnóstico en AD se basa en la evaluación clínica de parámetros relacionados con un deterioro progresivo de la memoria y un deterioro cognitivo generalizado. Para tratar de descubrir fenotipos clínicos relevantes en los animales Nlgn1 Thr271fs se realizó una batería de pruebas de conducta. Para analizar alteraciones específicas generadas por un efecto de dosis de proteína, se analizaron en paralelo animales HTZ y HMZ Nlgn1 Thr271fs.

Se han identificado mutaciones en *NLGN3* y *NLGN4X* en enfermedades del neurodesarrollo, especialmente en pacientes con trastornos del espectro autista (TEA) (Chanda et al., 2016; Etherton et al., 2011; Jamain et al., 2003; Laumonnier et al., 2004; C. Zhang et al., 2009). En pacientes, el diagnóstico del TEA se basa en características de comportamiento definidas por patrones repetitivos de conducta y defectos persistentes

en la interacción y comunicación sociales. Para analizar si la pérdida de *Nlgn1* genera un fenotipo asociado a trastornos del neurodesarrollo, se realizaron una serie de pruebas de comportamiento diseñadas para evaluar en roedores los comportamientos análogos a las alteraciones encontradas en pacientes, como la prueba de campo abierto, para evaluar hiperactividad y ansiedad, la prueba de acicalamiento, para evaluar patrones repetitivos y la prueba de las 3 habitaciones, para evaluar la interacción social (Crawley, 2012; Pasciuto et al., 2015; Silverman et al., 2010).

Los siguientes experimentos se realizaron en una cohorte de animales de entre 4 y 8 meses de edad compuesta por una N de 9-18 animales *wild type*, 9-23 animales HTZ *Nlgn1 Thr271fs* y 9-18 animales HMZ *Nlgn1 Thr271fs*. La N empleada en cada prueba queda especificada en la descripción de estas.

4.2.2.1 Análisis de locomoción exploratoria: Test de campo abierto

Uno de los principales síntomas asociados a enfermedades del neurodesarrollo es el comportamiento ansioso e hiperactivo. Para evaluar la presencia de dichos síntomas se analizó la locomoción general de los animales en la prueba de campo abierto. En esta, prueba se colocó al animal en una arena vacía de 45 x 45 cm con paredes opacas y se le dejó explorar libremente durante 15 minutos. Esta prueba nos permitió analizar el estado general de locomoción del animal midiendo la distancia total recorrida durante la exploración. Además, el espacio abierto del centro de la arena provoca una inseguridad innata en los animales (Choleris et al., 2001), por lo que el número de entradas al centro es una medida del nivel de ansiedad de estos.

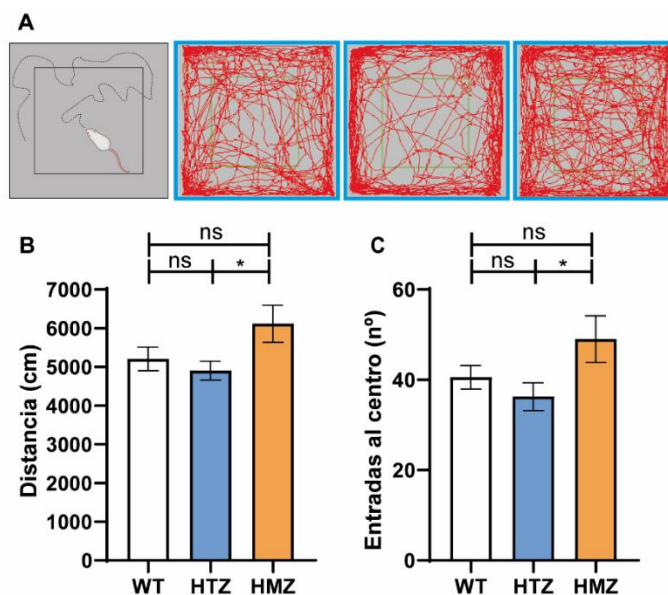


Figura 40. Test de campo abierto. A.- De izquierda a derecha, representación gráfica del test, trazados representativos de las trayectorias recorridas por ratones *wild type*, HTZ *Nlgn1 Thr271fs* y HMZ *Nlgn1 Thr271fs*. Trazados obtenidos mediante el *software Smart*. B.- Distancia total recorrida. C.- Número de entradas a la zona central. N= 18 *wild type*, 23 HTZ *Nlgn1 Thr271fs*, 18 HMZ *Nlgn1 Thr271fs*. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey. * $p < 0.05$. Las barras de error representan la SEM. Representación gráfica del test generada con Biorrender.com

Observamos que, mientras que los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs recorrían una distancia total similar a los animales *wild type*, los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs recorrieron una distancia un 20% mayor respecto a sus hermanos de camada, alcanzando diferencias significativas respecto a animales HTZ (*wild type* 5206 ± 303.5; HTZ Nlgn1 Thr271fs 4902 ± 244.6; HMZ Nlgn1 Thr271fs 6116 ± 476.7, distancia en cm ± SEM) (Figura 40). Este incremento en la distancia total recorrida en los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs vino acompañado de un incremento significativo del 30% respecto a animales HTZ en las entradas a la zona central de la arena (*wild type* 40.56 ± 2.644; HTZ Nlgn1 Thr271fs 36.26 ± 3.078; HMZ Nlgn1 Thr271fs 49.00 ± 5.167, número de entradas ± SEM) (Figura 40).

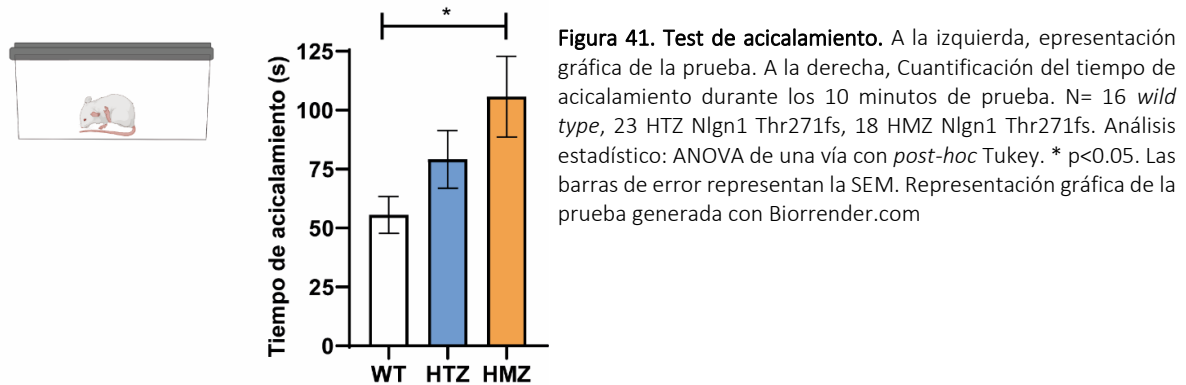
Estos datos sugieren que la ausencia total de Nlgn1 produce un fenotipo de ligera hiperactividad que se preserva con una dosis parcial de Nlgn1. El mayor número de entradas al centro observado en los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs podría deberse a la propia hiperactividad, ya que recorren una distancia mayor por toda la arena.

4.2.2.2 Análisis de patrones repetitivos: Test de acicalamiento

Otro de los síntomas asociados a problemas del neurodesarrollo en pacientes son los comportamientos repetitivos (American Psychiatric Association [APA], 2022). En modelos animales de TEA se analiza el tiempo que emplean los animales en acicalarse para evaluar dicha conducta. Estos modelos, como los deficientes en la proteína SHANK o con disfunción en Nrxn1, muestran un claro incremento en el tiempo de acicalamiento (Jaramillo et al., 2017; Y. Jiang & Ehlers, 2013; Peça et al., 2011; Rabaneda et al., 2014). Para evaluar si la pérdida total o parcial de Nlgn1 se relaciona con la aparición de estereotipias, se analizó el tiempo que invertían los animales Nlgn1 Thr271fs en acicalarse. Se colocaron a los animales en una batea transparente y se grabó el comportamiento de estos durante 10 minutos desde una vista frontal. Se cuantificó manualmente el tiempo que pasaban realizando el patrón de movimientos de acicalamiento.

Los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs realizaron un tiempo de acicalamiento de casi el doble del empleado por sus hermanos de camada *wild type*, alcanzando significancia estadística (Figura 41). Sin embargo, los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs mostraron tiempos similares a los controles, aunque se observó una tendencia al incremento (*Wild type* 55.53 ± 7.81; HTZ Nlgn1 Thr271fs 79.19 ± 12.26; HMZ Nlgn1 Thr271fs 105.80 ± 17.13.

$p < 0.05$. Tiempo en segundos \pm SEM.) (Figura 41). Este aumento en el tiempo de acicalamiento en los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs parece indicar que la ausencia de Nlgn1 genera un incremento en comportamientos repetitivos a pesar de la ligera hiperactividad observada en la prueba del campo abierto.



4.2.2.3 Análisis de interacción social: Test de las tres habitaciones

Una de las conductas afectadas en las enfermedades del neurodesarrollo es la interacción social. Para evaluar si la pérdida de Nlgn1 afecta a la interacción social, realizamos la prueba de las tres habitaciones. Se colocó al animal en la habitación central de una caja dividida en tres estancias conectadas (una habitación central y dos habitaciones laterales). En las salas laterales el animal puede encontrar un cilindro con un estímulo no social (objeto inanimado) o un estímulo social (animal de la misma edad y sexo). Para evaluar la preferencia innata de los roedores por la interacción social se analizó el tiempo de interacción de los animales con los dos estímulos. Los animales *wild type* y HTZ Nlgn1 Thr271fs mostraron una clara preferencia por interactuar con el estímulo social en lugar de con el objeto inanimado (Figura 42). Los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs mostraron una ligera reducción no significativa en el tiempo de interacción con el estímulo social (Tiempo de interacción con el objeto: *Wild type* 25.04 ± 5.027 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs 21.66 ± 4.025 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs 28.80 ± 4.12 ; tiempo de interacción con el ratón: *Wild type* 138.0 ± 13.50 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs 122.0 ± 20.44 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs 88.11 ± 15.04 . Tiempo en segundos \pm SEM) (Figura 42). Este descenso en la preferencia social observada en los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs también se vio reflejado en un ligero descenso en el índice social, calculado como la diferencia porcentual de la interacción con el ratón respecto del tiempo total de interacción (*Wild*

type 33.08 ± 3.98 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs 30.44 ± 4.58 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs 22.92 ± 4.67 índice \pm SEM) (Figura 42).

Estos datos sugieren que la ausencia total de Nlgn1 produce ligeros defectos en la interacción social, mientras que la pérdida parcial asociada con AD no genera ningún defecto observable relacionado con enfermedades del neurodesarrollo.

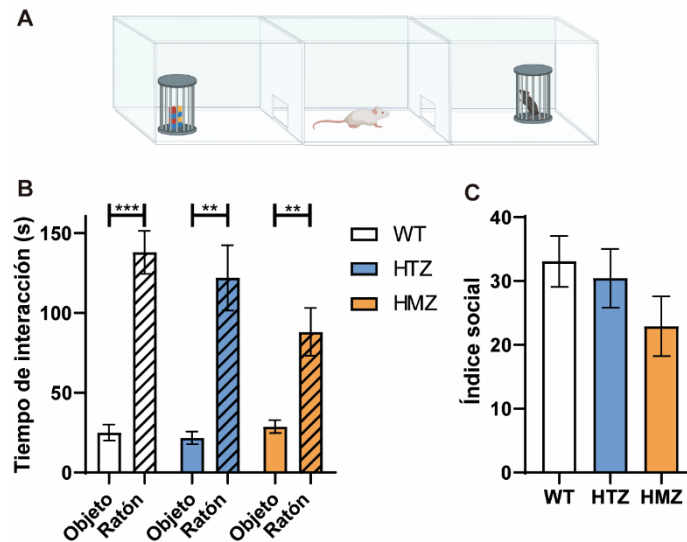


Figura 42. Test de las tres habitaciones. A.- Representación gráfica de la prueba. B.- Tiempo de interacción con el ratón o el objeto durante la fase de test. C.- Índice social calculado como [(t interacción Ratón/t inter total) *100-50]. N= 10 *wild type*, 11 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 8 HMZ Nlgn1 Thr271fs. Análisis estadístico: *t-test* para cada genotipo en B, ANOVA con *post-hoc* Tukey en C. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Representación gráfica del test generada con Biorrender.com

En conjunto, el aumento observado en la locomoción, el incremento en el tiempo de acicalamiento y el ligero descenso en la interacción social presentes en los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs con ausencia total de Nlgn1 concuerdan con los fenotipos previamente observados en el ratón *KO* Nlgn1 (Blundell et al., 2010). En el análisis fenotípico de los animales *KO* Nlgn1 se encontró un incremento en el tiempo de acicalamiento espontáneo superior a dos veces el realizado por los animales *wild type*, un leve descenso en la interacción social y, a diferencia de los datos obtenidos en los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs, se reportó una actividad locomotora normal (Blundell et al., 2010).

4.2.2.4 Evaluación de la memoria

La pérdida progresiva de la memoria es uno de los marcadores distintivos en el deterioro cognitivo producido en AD. Para esclarecer el impacto que pudiera tener la pérdida de Nlgn1 en la memoria de los animales, realizamos una batería de pruebas a los

animales *Nlgn1 Thr271fs* para evaluar diferentes tipos de memoria, la memoria contextual, asociativa y memoria de trabajo.

4.2.2.4.1 Memoria asociativa: Test de condicionamiento al miedo

Para evaluar la memoria asociativa y emocional empleamos la prueba de condicionamiento al miedo. En la primera fase, se colocó al animal en un compartimento cerrado durante 2 minutos. Pasado este tiempo, recibió un estímulo sonoro de 30 s de duración (estímulo neutro) acompañado en sus últimos 5 s de un choque eléctrico (estímulo aversivo). Esta presentación de estímulos se repitió tres veces consecutivas, durante las cuales el ratón asocia el estímulo neutro y el contexto con la respuesta de miedo provocada por el estímulo aversivo. Pasadas 24 h, se colocó al animal en el mismo compartimento durante 5 minutos, pero en ausencia de estímulo sonoro (memoria contextual). A continuación, se cambió el contexto del compartimento, se introdujo al animal y se le presentó las tres repeticiones del estímulo sonoro (memoria del tono). El miedo en los roedores se evalúa por un comportamiento conocido como *freezing* o congelación, característico por la ausencia de movimientos salvo los respiratorios.

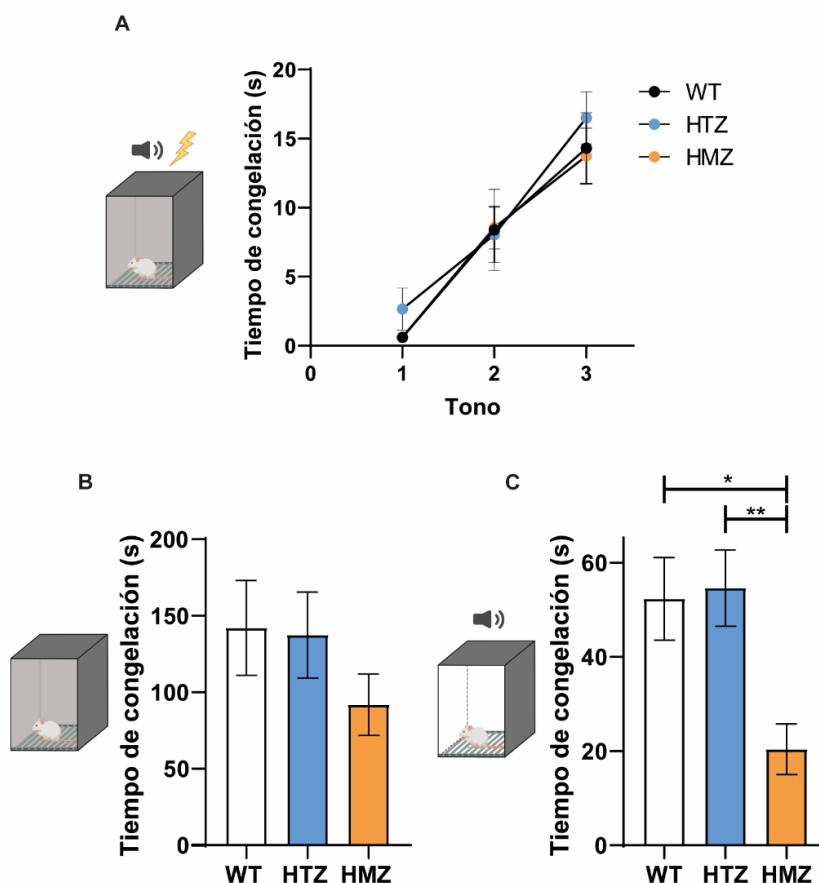


Figura 43. Test de condicionamiento al miedo. A.- Fase de condicionamiento. Tiempo de congelación realizado durante cada uno de los tonos presentados. B.- Evaluación de memoria contextual, tiempo de congelación realizado durante los 5 minutos del test. C.- Evaluación de memoria del tono. N= 9 *wild type*, 10 HTZ *Nlgn1 Thr271fs*, 9 HMZ *Nlgn1 Thr271fs*. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Las barras de error representan la SEM. Representación gráfica del test generada con Biorrender.com.

En la fase de condicionamiento, los animales HTZ y HMZ Nlgn1 Thr271fs presentaron tiempos similares de congelación a los tres tonos respecto a los animales *wild type* (Tono 1: *Wild type* 0.60 ± 0.283 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs 2.662 ± 1.51 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs 0.62 ± 0.368 . Tono 2: *Wild type* 8.40 ± 2.94 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs 8.036 ± 2.945 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs 8.55 ± 1.55 . Tono 3: *Wild type* 14.30 ± 2.57 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs 16.51 ± 1.89 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs 13.73 ± 2.02 . Tiempo en segundos \pm SEM) (Figura 43). Los tres genotipos mostraron un tiempo de congelación que fue incrementando con la presentación consecutiva de estímulos aversivos. Durante la exposición al contexto a las 24 horas, los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs realizaron un tiempo de congelación similar a los animales *wild type*, mientras que en los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs se observó una tendencia no significativa a una reducción (35% menos) del tiempo de congelación respecto a animales *wild type* (*Wild type* 142.1 ± 31.02 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs 137.5 ± 28.17 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs 91.85 ± 20.05 . Tiempo en segundos \pm SEM) (Figura 43). Durante la fase dependiente del estímulo sonoro, de nuevo, los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs no mostraron diferencias significativas en el tiempo de congelación realizado respecto a animales *wild type*, sin embargo, los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs mostraron una reducción significativa (61% menos) respecto a animales *wild type* (*Wild type* 52.32 ± 8.75 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs: 54.61 ± 8.07 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs 20.40 ± 5.39 . Tiempo en segundos \pm SEM) (Figura 43).

Hay disparidad entre la bibliografía respecto al efecto de Nlgn1 en el condicionamiento al miedo. Por un lado, se ha descrito una memoria condicionada normal en los animales *KO Nlgn1* (Blundell et al., 2010), mientras que otros autores han descrito defectos en la memoria en animales con un descenso agudo de Nlgn1 en la amígdala mediante *siRNA* (Kim et al., 2008). Nuestros datos indican que la pérdida total de Nlgn1 genera una deficiencia en la memoria asociativa mientras que, en animales con una reducción parcial de Nlgn1, este tipo de memoria se encuentra conservada.

4.2.2.4.2 Memoria espacial: Test del laberinto de Barnes

Para analizar si la memoria espacial se encontraba afectada en los animales Nlgn1 Thr271fs empleamos la prueba del laberinto de Barnes. La prueba se realizó como se ha descrito anteriormente (Andrade-Talavera et al., 2015). El animal se colocó en el centro de una plataforma redonda que contiene 20 agujeros en la periferia. Solo uno de los 20

agujeros contenía un pequeño refugio, el agujero de escape o *target*. En la pared, se colocaron estímulos visuales que sirven de guías espaciales para localizar el agujero de escape. En una primera fase, a los animales se les entrenó para encontrar el agujero de escape durante cuatro días consecutivos. Para incrementar la respuesta de escape producida por los espacios abiertos, durante esta fase se le presentaron estímulos aversivos (luz de alta intensidad y ventiladores alrededor de la plataforma). Durante la fase de entrenamiento se evaluó el tiempo que tardan los animales en encontrar el *target*. La cuantificación mostró que la latencia en encontrar el agujero de escape disminuyó progresivamente con los días de entrenamiento tanto en animales *wild type* como en HTZ y HMZ Nlgn1 Thr271fs conforme avanzaban los días de entrenamiento, aunque los animales HTZ mostraron un leve descenso en dicha latencia (*wild type* 140.85 ± 12.97, 103.50 ± 17.029, 103.35 ± 17.05, 95.46 ± 14.09; HTZ Nlgn1 Thr271fs 120.68 ± 10.29, 88.00 ± 14.75, 72.25 ± 11.47, 78.84 ± 16.89; HMZ Nlgn1 Thr271fs 132.30 ± 11.91, 103.44 ± 10.65, 121.11 ± 9.33, 110.44 ± 10.41. Tiempo en segundos ± SEM) (Figura 44).

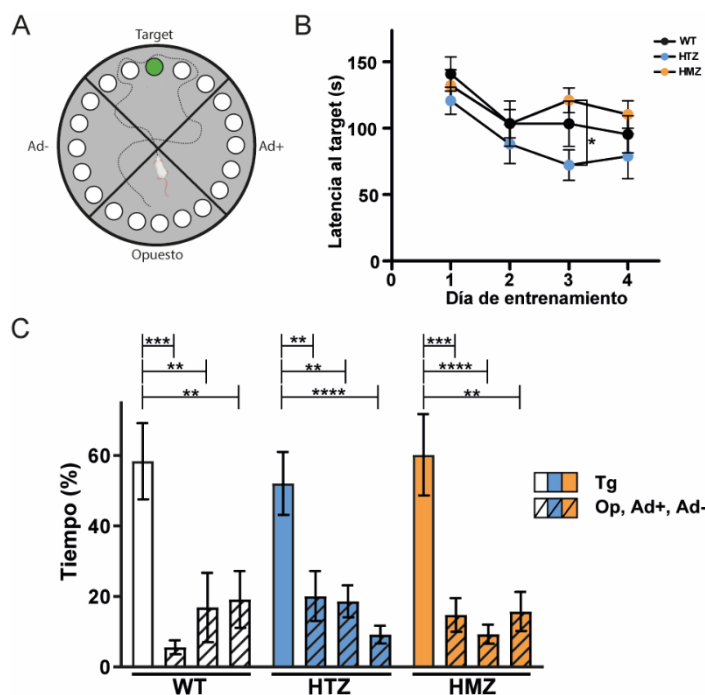


Figura 44. Test de laberinto de Barnes. A.- Representación gráfica del test. **B.-** Tiempo de latencia en llegar al agujero de escape durante los días de entrenamiento. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías de medidas repetidas con *post-hoc* Tukey. **C.-** Tiempo pasado en cada cuadrante durante el test a las 24 horas del último día de entrenamiento. N= 10 *wild type*, 11 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 9 HMZ Nlgn1 Thr271fs.- Análisis estadístico: Comparación dentro de cada genotipo del tiempo pasado respecto al cuadrante objetivo. ANOVA de una vía con *post-hoc* Dunnett. Las barras de error representan la SEM. Tg: cuadrante *target*; Op; cuadrante opuesto; Ad+: cuadrante adyacente derecho; Ad-: cuadrante adyacente izquierdo. Representación gráfica del test generada con Biorrender.com

Para evaluar la memoria espacial, a los animales se les expuso 24 horas más tarde a la misma plataforma con todos los agujeros cubiertos pero manteniendo las guías visuales. En esta fase, se cuantificó el tiempo de estancia en cada uno de los 4 cuadrantes en los que se dividió la plataforma (*target*, opuesto, adyacente + y adyacente -) para evaluar si los animales pueden recordar la localización del agujero de escape. La

cuantificación mostró que los animales HTZ y HMZ Nlgn1 Thr271fs pasaron un tiempo en el cuadrante *target* similar a animales *wild type* (Adyacente -: *wild type* 19.14 ± 8.06 , HTZ Nlgn1 Thr271fs 9.18 ± 2.53 , HMZ Nlgn1 Thr271fs 15.73 ± 5.52 ; objetivo: *wild type* 58.40 ± 10.82 , HTZ Nlgn1 Thr271fs 52.10 ± 8.91 , HMZ Nlgn1 Thr271fs 60.21 ± 11.55 ; adyacente +: *wild type* 16.89 ± 9.84 , HTZ Nlgn1 Thr271fs 18.61 ± 4.52 , HMZ Nlgn1 Thr271fs 9.30 ± 2.72 ; opuesto: *wild type*: 5.56 ± 1.96 , HTZ Nlgn1 Thr271fs: 20.10 ± 7.08 , HMZ Nlgn1 Thr271fs 14.75 ± 4.75 . Porcentaje total del tiempo pasado en cada cuadrante respecto al tiempo total del test \pm SEM) (Figura 44).

Previamente, se han descrito defectos en la memoria espacial en animales *KO* Nlgn1 empleando el *Morris Water Maze* (Blundell et al., 2010). Sin embargo, nuestros resultados no indicaron alteraciones en la memoria espacial realizando la prueba del laberinto de Barnes, prueba que es menos agresiva y estresante para los roedores que el laberinto en agua (Harrison et al., 2009).

4.2.2.4.3 Memoria de reconocimiento de objeto nuevo

La memoria de reconocimiento depende de la habilidad de distinguir entre entidades familiares y novedosas. La dificultad de discriminar entre estos dos tipos de estímulos es uno de los marcadores de déficit cognitivo observado en AD (American Psychiatric Association [APA], 2022). En roedores, se puede evaluar la memoria de reconocimiento empleando la prueba de reconocimiento de objeto. Esta prueba se basa en la preferencia innata en roedores por la novedad, por lo que no es necesario emplear ningún estímulo aversivo ni ninguna fase de entrenamiento previa (Vogel-Ciernia y Wood, 2014). En la primera fase del test, se colocaron dos objetos idénticos para que el animal se familiarizara con ellos. Transcurrida una hora, uno de los dos objetos familiares se cambió por un objeto nuevo, que no había sido presentado con anterioridad al animal. Durante la fase inicial de retención de los objetos familiares, los animales *wild type* y Nlgn1 Thr271fs mostraron tiempos similares de interacción con los dos objetos (*wild type*, 65.63 ± 4.67 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, 58.02 ± 5.62 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs, 67.37 ± 4.90 . Tiempo total de interacción con ambos objetos en segundos \pm SEM) (Figura 45). Sorprendentemente, encontramos un defecto en la memoria de reconocimiento en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs que no estaba presente en animales HMZ Nlgn1 Thr271fs. Los animales *wild type* y HMZ Nlgn1 Thr271fs mostraron una clara preferencia por el

objeto nuevo interactuando más con el mismo (Figura 45). Sin embargo, los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs presentaron una interacción muy similar entre el objeto familiar y nuevo, indicando un defecto en la memoria de reconocimiento (*wild type*, objeto familiar 34.87 ± 1.83 , objeto nuevo 65.13 ± 1.83 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, objeto familiar 44.97 ± 2.68 , objeto nuevo 55.03 ± 2.68 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs, objeto familiar 36.23 ± 1.87 , objeto nuevo 63.77 ± 1.87 . Tiempo en porcentaje respecto al tiempo de interacción total \pm SEM) (Figura 45). Esta falta de preferencia por el objeto nuevo también se vio reflejada en el índice de discriminación, calculado como (interacción objeto nuevo – interacción objeto familiar) / interacción total (tiempos en segundos). Los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs mostraron un descenso significativo en el índice de discriminación del 70% respecto a animales *wild type* y animales HMZ Nlgn1 Thr271fs, mientras que estos últimos mostraron un índice similar a animales *wild type* (*wild type*, 0.30 ± 0.03 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, 0.09 ± 0.05 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs, 0.27 ± 0.03) (Figura 45).

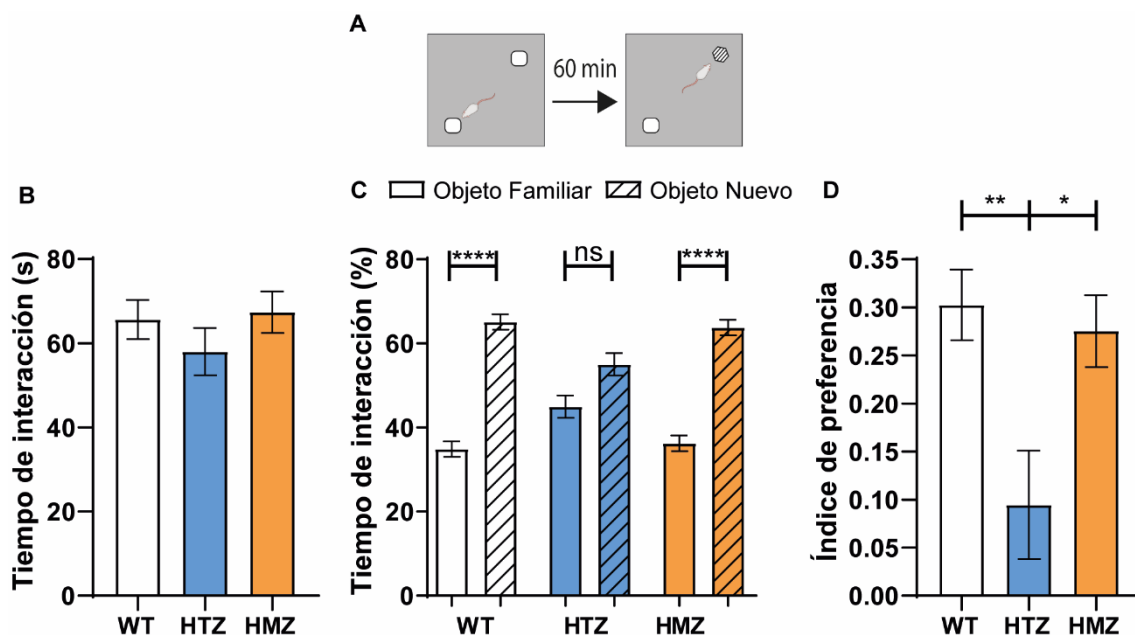


Figura 45. Test de reconocimiento de objeto. A.- Representación gráfica del test. B.- Tiempo de interacción total con los dos objetos durante la fase de retención. C.- Tiempo de interacción porcentual con cada objeto respecto al tiempo total de interacción 1 hora después de la retención D.- Índice de preferencia por el objeto nuevo. N= 15 *wild type*, 17 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 15 HMZNlgn1 Thr271fs. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey en B y D, *t-test* para cada genotipo en C. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan la SEM.

La memoria de reconocimiento depende de una fase de consolidación que ocurre pocos minutos después de la fase de retención. En ensayos de reconocimiento de objeto nuevo empleando inhibidores de la síntesis de proteínas en la corteza entorrinal, otros autores han observado que la memoria de reconocimiento se veía impedida cuando la administración se realizaba inmediatamente después de la fase de entrenamiento,

mientras que la administración más tardía del fármaco no tenía ningún impacto en la memoria de reconocimiento (Hammond et al., 2004; Lima et al., 2009). Para analizar si los defectos de memoria de reconocimiento de los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs se debían a defectos en la formación inicial de la memoria o en la fase de consolidación, evaluamos la memoria de reconocimiento a tiempos más cortos después de la fase de retención.

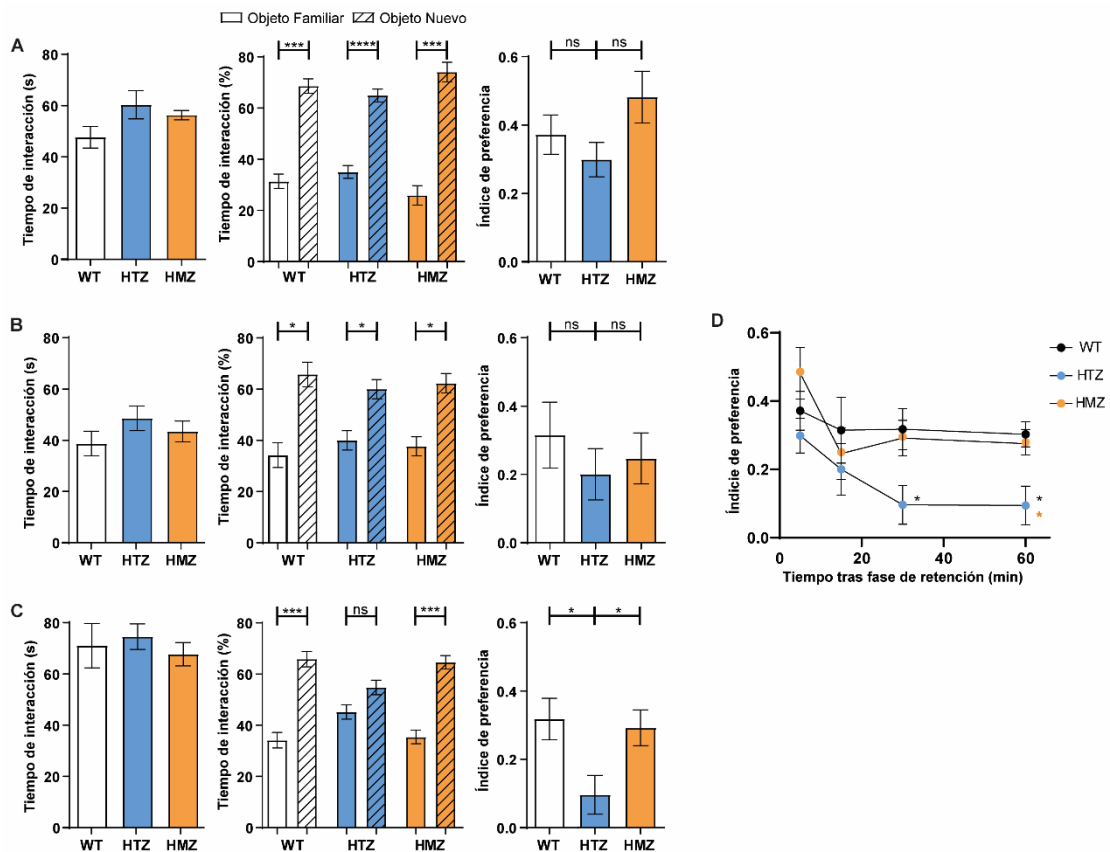


Figura 46. Test de reconocimiento de objeto a tiempos cortos tras retención. A, B y C.- De izquierda a derecha, tiempo de interacción total con los dos objetos durante la fase de retención; tiempo de interacción porcentual con cada objeto respecto al tiempo total de interacción después de la retención; índice de preferencia por el objeto nuevo. **A.-** Test 5 minutos después de la retención. N= 10 *wild type*, 16 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 8 HMZNlgn1 Thr271fs. **B.-** Test 15 minutos después de la retención. N= 9 *wild type*, 12 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 8 HMZ Nlgn1 Thr271fs. **C.-** Test 30 minutos después de la retención. N= 9 *wild type*, 14 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 9 HMZ Nlgn1 Thr271fs. **D.-** Índice de preferencia a distintos tiempos tras la retención. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey para los tiempos totales de interacción y el índice de preferencia, *t-test* para cada genotipo en tiempo de interacción en porcentaje. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan la SEM.

Los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs mostraron una preferencia por el objeto nuevo cuando este se le presentaba 5 minutos después de la fase de retención, reflejando un índice de discriminación similar a los animales *wild type* (*wild type*, 0.37 ± 0.05 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, 0.29 ± 0.05 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs, 0.48 ± 0.07) (Figura 46). Estos datos indican que los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs muestran memoria de reconocimiento cuando se evalúa a tiempos cortos tras la retención. Sin embargo, encontramos que esta

preferencia por el objeto nuevo descendía notablemente cuando se evaluó la memoria 15 minutos después de la fase de retención (*wild type*, 0.31 ± 0.09 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, 0.20 ± 0.07 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs, 0.24 ± 0.07) (Figura 46) y desaparecía por completo a los 30 minutos tras la fase de retención (*wild type*, 0.31 ± 0.06 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, 0.09 ± 0.05 ; HMZ Nlgn1 Thr271fs, 0.29 ± 0.05) (Figura 46). Esta pérdida de la memoria de reconocimiento a tiempos cortos tras la retención era específica de animales HTZ Nlgn1 Thr271fs, ya que los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs con una pérdida total de Nlgn1 no mostraron ningún defecto en la memoria de reconocimiento a estos intervalos (Figura 46).

4.2.3 Análisis fenotípico de una población envejecida de animales *knockin* Nlgn1 Thr271fs

El análisis de comportamiento reveló una serie de defectos de memoria específicos en los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs que no se encontraron en los ratones HMZ Nlgn1 Thr271fs y viceversa. Mientras que la ausencia de defectos en la memoria condicionada de miedo de los ratones HTZ Nlgn1 Thr271fs podría explicarse por efectos de la dosis de Nlgn1, la memoria normal de reconocimiento de los ratones HMZ Nlgn1 Thr271fs sugería que el descenso parcial de Nlgn1 asociados a AD afecta la memoria de una forma no prevista por un descenso total. Sin embargo, otra posibilidad es que los defectos provocados por una pérdida parcial de Nlgn1 coincidieran con los defectos causados por una ausencia total de Nlgn1, pero más tarde en el tiempo. Para analizar una posible convergencia fenotípica de los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs con la edad a los déficits encontrados en los HMZ Nlgn1 Thr271fs, realizamos nuevos ensayos de comportamiento en animales envejecidos. Para ello, se creció una nueva población de animales HTZ Nlgn1 Thr271fs hasta los 13-18 meses de edad.

En la prueba de condicionamiento al miedo, encontramos que los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs no mostraron ningún déficit de memoria (Figura 47). En la fase de condicionamiento, los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs mostraron un incremento en el tiempo de congelación durante la presentación de los estímulos neutros similar al observado en los animales *wild type* (Tono 1: *Wild type* 3.29 ± 1.83 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs 2.34 ± 1.31 . Tono 2: *Wild type* 9.025 ± 2.93 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs 6.74 ± 1.84 . Tono 3: *Wild type* 10.03 ± 3.32 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs 9.84 ± 2.47 . Tiempo en segundos \pm SEM) (Figura 100

47). En la presentación del contexto 24 horas más tarde, los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs mostraron un tiempo de congelación similar a los animales *wild type* (*Wild type* 90.42 ± 26.41 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs 89.21 ± 16.71 Tiempo en segundos \pm SEM) (Figura 47). Durante la exposición posterior a los tres estímulos sonoros, de nuevo, los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs no mostraron diferencias significativas respecto a animales *wild type* (*wild type* 36.96 ± 6.85 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs 34.73 ± 6.96 . Tiempo en segundos \pm SEM) (Figura 47).

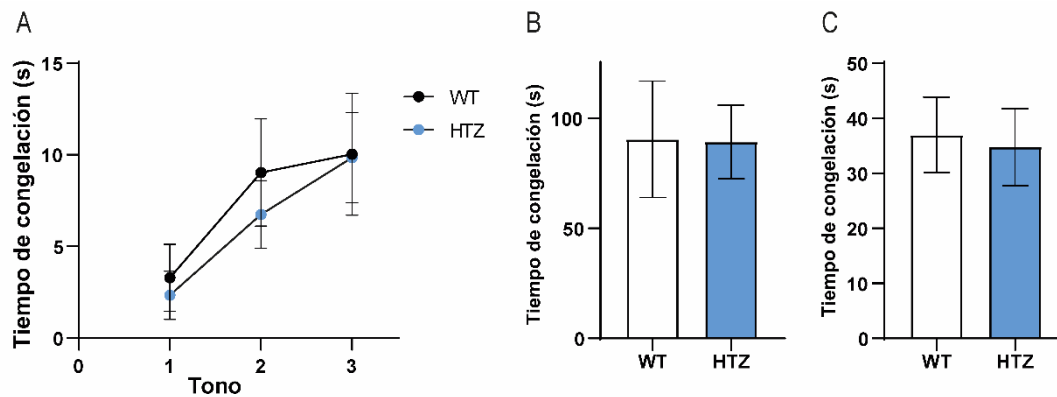


Figura 47. Test de condicionamiento al miedo en animales envejecidos. A.- Fase de condicionamiento. Tiempo de congelación realizado durante cada uno de los tonos presentados. B.- Fase de presentación al contexto, tiempo de congelación realizado durante los 5 minutos del test. C.- Fase de presentación del tono. N= 13 *wild type*, 13 HTZ Nlgn1 Thr271fs. Análisis estadístico: *T-test*. Las barras de error representan la SEM.

Por otro lado, realizamos la prueba de reconocimiento de objeto nuevo para comprobar si los defectos en la consolidación de la memoria se conservaban en animales envejecidos. Encontramos que, de nuevo, los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs eran capaces de discriminar el objeto nuevo cuando se les mostraba 5 o 15 minutos después de la fase de retención, mostrando mayor tiempo de interacción con el objeto nuevo que con el familiar alcanzando significancia estadística (Memoria a 5 minutos: *wild type*, objeto familiar 28.57 ± 5.56 , objeto nuevo 71.43 ± 5.56 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, objeto familiar 38.91 ± 3.18 , objeto nuevo 61.09 ± 3.18 . Memoria a 15 minutos: *wild type*, objeto familiar 32.28 ± 2.69 , objeto nuevo 67.72 ± 2.69 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, objeto familiar 39.07 ± 3.63 , objeto nuevo 60.93 ± 3.63 . Porcentaje respecto al tiempo de interacción total \pm SEM) (Figura 48). Sin embargo, pasados 30 minutos desde la fase de retención, esta capacidad de discriminación desaparecía en ratones HTZ Nlgn1 Thr271fs, que pasaron a interactuar el mismo tiempo con el objeto familiar que con el objeto nuevo (Figura 48). Los animales HTZ Thr271fs tampoco fueron capaces de discriminar entre objeto nuevo y familiar cuando se examinó la memoria de reconocimiento pasados 60 minutos desde la

fase de retención. Estos efectos se vieron claramente reflejados en el índice de discriminación (Memoria a 30 minutos: *wild type* 0.45 ± 0.03 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, 0.01 ± 0.07 . Memoria a 60 minutos: *Wild type*, 0.25 ± 0.03 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, 0.01 ± 0.03) (Figura 48).

Las cuantificaciones mostraron que, a pesar de que los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs fueron capaces de discriminar entre objeto nuevo y familiar cuando se evaluó la memoria 5 y 15 minutos tras la fase de retención, reflejaron un descenso no significativo en el índice de discriminación respecto a animales *wild type*. Este descenso en el índice de discriminación de la población de animales HTZ Nlgn1 Thr271fs envejecidos fue más acusado respecto a la población adulta (Figuras 46 y 48), sugiriendo una ligera progresión del déficit en la consolidación de la memoria con la edad.

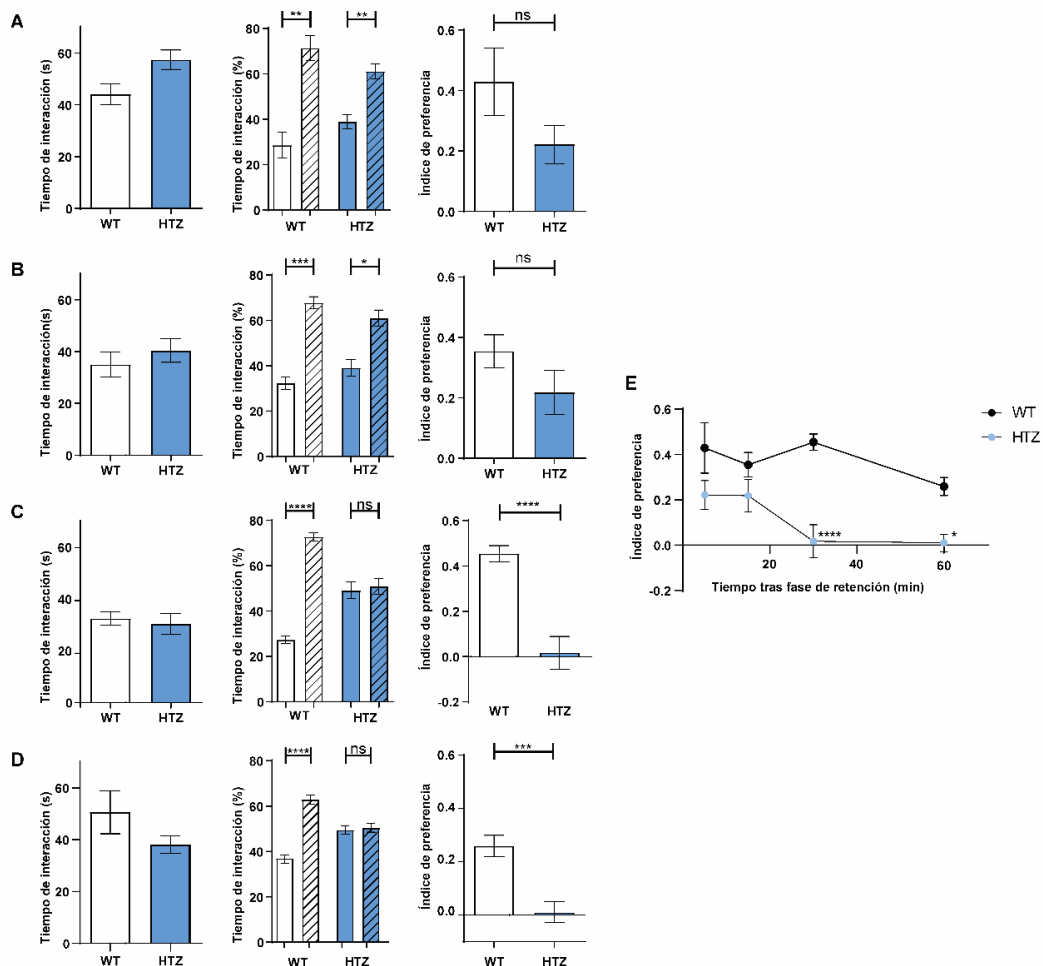


Figura 48. Test de reconocimiento de objeto en animales envejecidos. A, B, C y D. - De izquierda a derecha, tiempo de interacción total con los dos objetos durante la fase de retención; tiempo de interacción porcentual con cada objeto respecto al tiempo total de interacción después de la retención; índice de preferencia por el objeto nuevo. **A.**- Test 5 minutos después de la retención. N= 11 *wild type*, 13 HTZ Nlgn1 Thr271fs. **B.**- Test 15 minutos después de la retención. N= 10 *wild type*, 12 HTZ Nlgn1 Thr271fs. **C.**- Test 30 minutos después de la retención. N= 11 *wild type*, 10 HTZ Nlgn1 Thr271fs. **D.**- Test 60 min después de la retención. N= 12 *wild type*, 14 HTZ Nlgn1 Thr271fs. **E.**- Índice de preferencia a distintos tiempos tras la retención. Análisis estadístico: *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan la SEM.

En conjunto, estos datos muestran que los defectos específicos en la consolidación de la memoria de los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs se mantienen en animales envejecidos y que, por otra parte, no aparecen de defectos en la condicionada al miedo asociada a una pérdida total de Nlgn1. Estos resultados indican que la pérdida parcial de Nlgn1 asociada a AD afecta a la memoria de una forma específica, de tal manera que no se puede acelerar mediante una pérdida total de Nlgn1.

4.2.4 Análisis de los defectos de memoria en los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs

Para profundizar en los defectos de memoria de reconocimiento observados en los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs y en las posibles estructuras cerebrales implicadas, realizamos la prueba de reconocimiento de objeto en dos paradigmas distintos. Se ha documentado que permitir una exploración de más o menos tiempo de los objetos durante la fase de retención genera una memoria del objeto fuerte o débil, respectivamente (Cinalli et al., 2020). Según Cinalli et al., 2020, la inactivación de las sinapsis en la región CA1 del hipocampo tiene un impacto en la memoria de reconocimiento fuerte, pero no en la débil. Por el contrario, la inactivación de la actividad neuronal en la corteza perirrinal, tiene un efecto sobre la memoria débil y no sobre la memoria fuerte. Con el objetivo de poder identificar regiones cerebrales implicadas en los defectos en memoria de reconocimiento observados en los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs analizamos la memoria fuerte y débil. Para el análisis de la memoria débil y memoria fuerte, a los animales se les permitió interactuar con los objetos un máximo de 11 s y 30s, respectivamente, durante la fase de retención, contabilizando el tiempo acumulado de interacción con los dos objetos idénticos. En ambos casos, la memoria se analizó una hora después de la fase de retención. Esta prueba se realizó en una nueva población de animales *wild type* y HTZ Nlgn1 Thr271fs de 10 meses de edad.

Encontramos que los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs realizaron una interacción muy similar entre objeto familiar y objeto nuevo en ambas pruebas (Figura 49). Los animales *wild type* mostraron una clara discriminación entre objeto familiar y nuevo en ambos paradigmas (Memoria fuerte: *wild type*, objeto familiar 32.51 ± 3.91 , objeto nuevo 67.49 ± 3.91 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, objeto familiar 51.29 ± 1.69 , objeto nuevo 48.71 ± 1.69 . Memoria débil: *wild type*, objeto familiar 36.36 ± 3.05 , objeto nuevo 63.64 ± 3.053 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, objeto familiar 48.51 ± 1.305 , objeto nuevo 51.49 ± 1.30 . Tiempo en

porcentaje respecto al tiempo de interacción total \pm SEM) (Figura 49). Observamos un ligero descenso en el índice de preferencia de los animales *wild type* en la prueba de memoria débil respecto a la prueba de memoria fuerte, como cabría esperar, debido a menor tiempo de interacción con los objetos familiares. En animales HTZ Nlgn1 Thr271fs, el índice de interacción fue cercano a 0 tanto en la prueba de memoria débil como fuerte (Memoria fuerte: *wild type* 0.35 ± 0.07 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, -0.02 ± 0.03 . Memoria débil: *wild type*, 0.27 ± 0.06 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, $0.03 \pm 0.02 \pm$ SEM) (Figura 49).

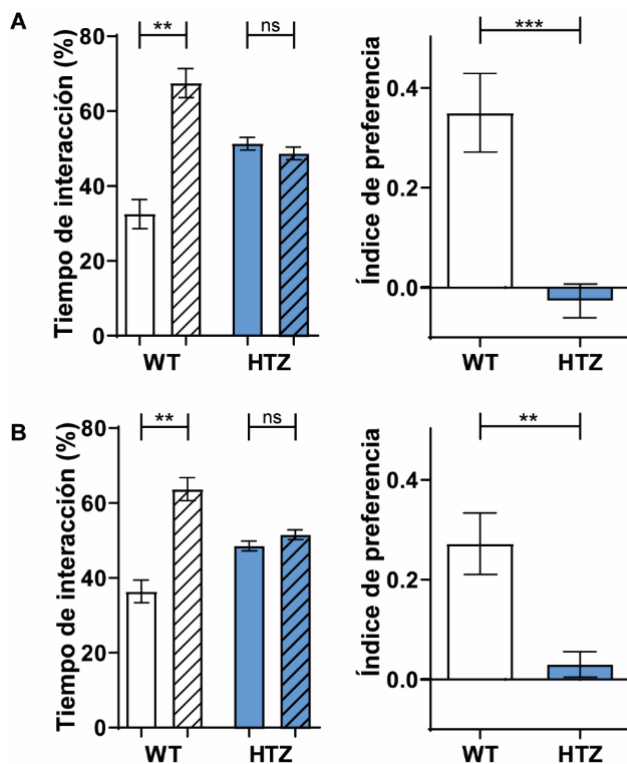


Figura 49. Memoria de reconocimiento de objeto en dos paradigmas distintos. A y B. - A la izquierda, tiempo de interacción porcentual con cada objeto respecto al tiempo total de interacción después de la retención; a la derecha, índice de preferencia por el objeto nuevo. **A.-** Memoria de reconocimiento de objeto tras establecer un tiempo máximo de interacción con los objetos familiares de 30 s durante la retención. N= 7 *wild type*, 9 HTZ Nlgn1 Thr271fs. **B.-** Memoria de reconocimiento de objeto tras establecer un tiempo máximo de interacción con los objetos familiares de 11 s durante la retención. N= 6 *wild type*, 9 HTZ Nlgn1 Thr271fs. Análisis estadístico: *t*-test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Las barras de error representan la SEM.

Estos datos parecen indicar que los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs podrían tener afectados los mecanismos de memoria de reconocimiento dependientes de corteza perirrinal y de hipocampo, ya que encontramos defectos en el reconocimiento de objeto tanto en el paradigma de memoria fuerte como en el de memoria débil.

El papel del hipocampo en la memoria de reconocimiento es controversial. Encontramos varios estudios donde se describen defectos en la memoria de reconocimiento de objeto nuevo inducidos por lesiones en el hipocampo (Ainge et al., 2006; Broadbent et al., 2010; Clark et al., 2000). Sin embargo, la mayoría de los autores observaron este tipo de memoria conservada tras lesionar esta región cerebral (Albasser et al., 2012; Forwood et al., 2005; Gaskin et al., 2003; Mumby et al., 2005; Winters et al.,

2004). Estos autores postulan que la memoria de reconocimiento es esencialmente dependiente de la corteza perirrinal. Nuestros experimentos no permiten distinguir directamente entre estas posibilidades, pero estos datos podrían indicar que los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs pudieran tener una disfunción en la corteza perirrinal, sin descartar defectos en el hipocampo.

Por otro lado, para analizar posibles defectos en la memoria espacial, tras la evaluación de la memoria de reconocimiento fuerte y débil, sometimos a los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs a la prueba de reconocimiento de objeto desplazado. Al igual que la prueba de reconocimiento de objeto nuevo, esta prueba se basa en el impulso innato de los roedores por explorar la novedad, en este caso, una nueva localización del objeto.

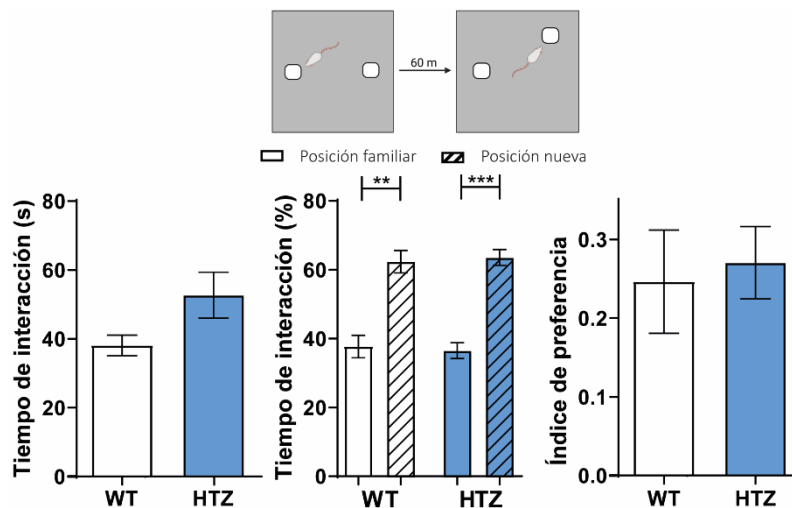


Figura 50. Test de reconocimiento de objeto desplazado. De izquierda a derecha, tiempo de interacción total con los dos objetos durante la fase de retención; tiempo de interacción porcentual con cada objeto respecto al tiempo total de interacción después de la retención; índice de preferencia por el objeto desplazado. N= 6 *wild type*, 9 HTZ Nlgn1 Thr271fs. Análisis estadístico: *t*-test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Las barras de error representan la SEM.

Durante la prueba de objeto desplazado, se les presentó a los animales dos objetos idénticos durante la fase de retención, y una hora después, se evaluó la memoria espacial desplazando uno de los dos objetos (Figura 50). Encontramos que los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs fueron capaces de discriminar el objeto desplazado respecto del que se mantenía en la posición original, presentando unos tiempos de interacción con el objeto en posición familiar y nueva muy similares a los animales *wild type* (*wild type*, posición familiar 37.68 ± 3.27 , posición nueva 62.32 ± 3.27 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, posición familiar 36.48 ± 2.29 , posición nueva 63.52 ± 2.29 . Tiempo en porcentaje respecto al tiempo de interacción total \pm SEM) (Figura 50). Tampoco observamos diferencias en el índice de

preferencia entre animales *wild type* y animales HTZ Nlgn1 Thr271fs (*wild type*, 0.246 ± 0.06 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, 0.270 ± 0.04) (Figura 50).

Estos datos indican que los defectos en la memoria de reconocimiento de los ratones HTZ NL1 Thr271fs no se ven afectados por un mayor o menor tiempo de exploración de los objetos. Además, el hecho de que los ratones HTZ NL1 Thr271fs fueran capaces de reconocer un objeto desplazado en el mismo entorno, indica un defecto específico de la memoria de reconocimiento en los ratones HTZ NL1 Thr271fs asociados con AD.

4.3 Caracterización sináptica de los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs

La pérdida y deterioro de las sinapsis es una de las características principales en AD (DeKosky & Scheff, 1990; Terry et al., 1991). Nlgn1 es uno de los componentes principales de las sinapsis glutamatérgicas, donde puede reclutar receptores AMPA (AMPA) y NMDA (NMDAR) a través de interacciones mediadas por los dominios intra- y extracelulares (Budreck et al., 2013; Heine et al., 2008; Song et al., 1999).

Para analizar la densidad sináptica, realizamos un análisis cuantitativo de las sinapsis empleando la tinción de Golgi-Cox, que tiñe un porcentaje de neuronas (soma y dendritas) haciendo posible la visualización y cuantificación de las espinas dendríticas. Mediante este método, encontramos un número similar de espinas dendríticas en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs y *wild type* en neuronas de la región CA1 del hipocampo, tanto en animales jóvenes como animales envejecidos (Animales de 5 meses: *wild type*, 10.16 ± 1.03 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, 10.29 ± 0.77 . Animales de 25 meses: *wild type*, 8.41 ± 0.62 ; HTZ Nlgn1 Thr271fs, 7.84 ± 0.65 . Densidad de espinas dendríticas por cada $10 \mu\text{m} \pm \text{SEM}$) (Figura 51). Estos datos apuntan a que la pérdida parcial de Nlgn1 actúa a través de un mecanismo distinto a la pérdida del número de sinapsis.

Por otro lado, para comprobar si la composición de las sinapsis se veía alterada por los niveles de Nlgn1 decidimos estudiar mediante experimentos de *Western blot* diferentes componentes sinápticos que pudieran verse afectados. No encontramos cambios en los niveles de las subunidades AMPAR GluR1 y GluR2 en el hipocampo de animales HTZ Nlgn1 Thr271fs envejecidos (Figura 51). Se ha descrito con anterioridad un incremento compensatorio en los niveles de Nlgn3 en animales KO Nlgn1 (Blundell et al.,

2010; Dang et al., 2018). Dado que alteraciones en Nlgn3 producen déficits en las corrientes NMDAR/AMPA (Chanda et al., 2016; Etherton et al., 2011; Polepalli et al., 2017), analizamos los niveles de Nlgn3 en animales Nlgn1 Thr271fs. Encontramos un incremento específico en los niveles de Nlgn3 en el hipocampo de animales HMZ Nlgn1 Thr271fs en ratones jóvenes y envejecidos (Figura 51). Sin embargo, el incremento en Nlgn3 no se observó en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs (Figura 51). Estos resultados indican la aparición de un posible mecanismo compensatorio disparado ante la ausencia total de Nlgn1 que no se induce ante la pérdida parcial de la misma.

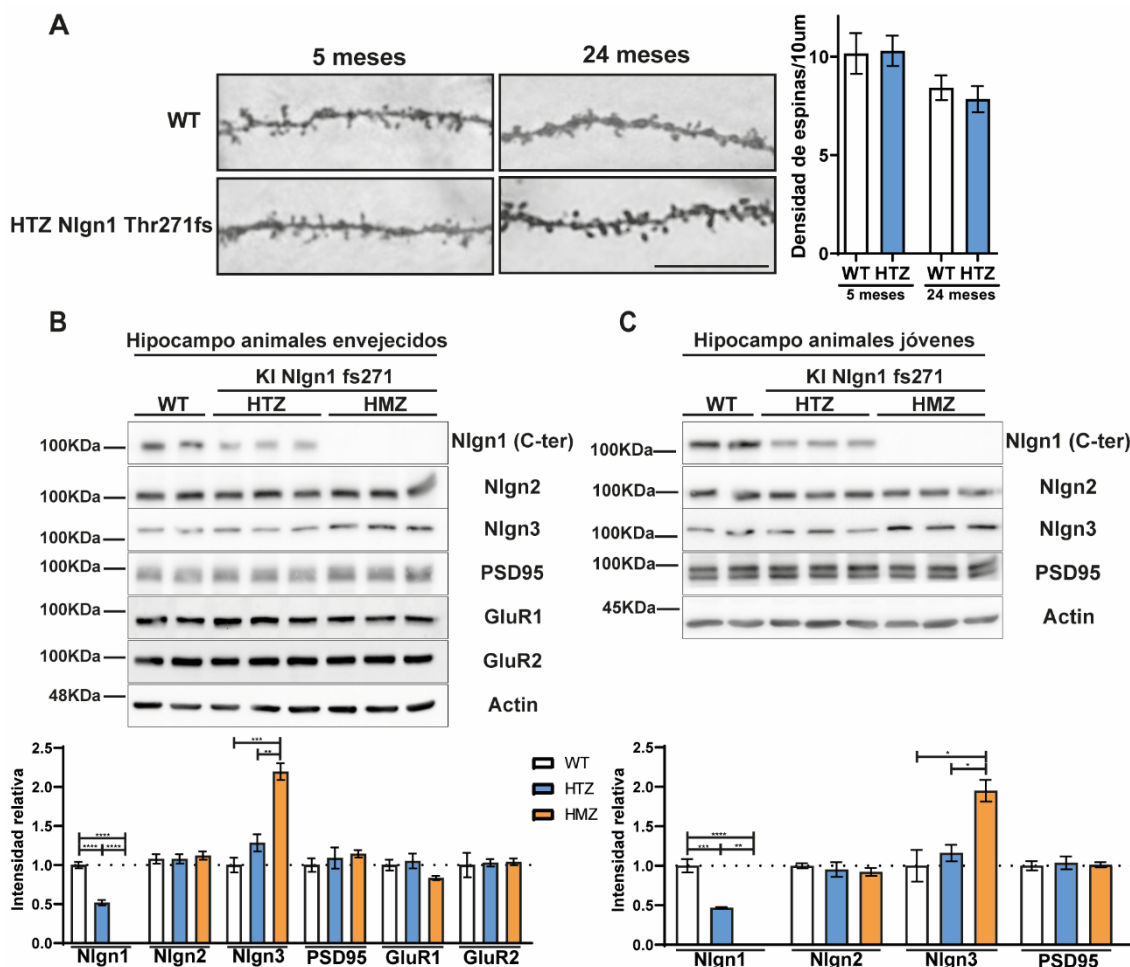


Figura 51. Análisis de número de espinas dendríticas y componentes sinápticos en animales KI Nlgn1. **A.-** A la izquierda, imagen representativa de la cuantificación de espinas dendríticas en dendritas secundarias de la región CA1 del hipocampo de animales jóvenes y envejecidos. La barra de escala representa 10 µm. A la derecha, cuantificación de la densidad de espinas dendríticas de 4-5 animales independientes por genotipo y 8-20 segmentos dendríticos por animal. Análisis estadístico: *t-test* para cada grupo de edad. **B y C.-** Expresión de componentes sinápticos en el hipocampo de animales envejecidos (B) y jóvenes (C). Abajo, se muestran las cuantificaciones normalizadas por actina y relativas al promedio de los animales *wild tipe*. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey para cada marcador analizado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan la SEM.

En conjunto, la mutación Nlgn1 Thr271fs asociada a AD genera un alelo nulo que impide la expresión de Nlgn1. La falta de Nlgn1 tiene un impacto diferente en función de si la pérdida es total o parcial. Los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs muestran defectos en la

memoria de reconocimiento. Por el contrario, los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs tienen defectos en la memoria condicionada al miedo y ciertos fenotipos asociados a trastornos del neurodesarrollo. La pérdida total, pero no parcial, de Nlgn1 dispara un mecanismo compensatorio que puede alterar la presentación fenotípica. Estos datos sugieren que la pérdida parcial de Nlgn1 asociada a AD puede contribuir a los defectos de memoria en AD por un mecanismo no compartido por modelos animales que reproducen una pérdida total de Nlgn1.

5 Interacción de Neuroliguina1 y APP

De entre los sustratos de PS/ γ -secretasa, APP ha obtenido más relevancia por su relación con las placas amiloides que aparecen en casos de AD. Datos recientes sugieren la existencia de una interacción funcional entre APP y/o sus metabolitos con el complejo Nrxns-Nlgn1. Se ha demostrado la interacción del péptido A β con Nlgn1 y Nrxns mediante ensayos de interacción (Brito-Moreira et al., 2017; Dinamarca et al., 2011; Naito et al., 2017). Además, se ha sugerido que el péptido A β podría generar una disfunción en la transmisión sináptica glutamatérgica en el hipocampo y defectos en la memoria espacial mediante la reducción de los niveles de Nlgn1 por mecanismos epigenéticos (Bie et al., 2014a).

Estos datos apuntan a una posible interacción de APP y de sus metabolitos con el complejo Nrxns-Nlgn1 a dos niveles, *upstream* o *downstream*. Por un lado, si los defectos causados por el péptido A β actuasen mediante una reducción en los niveles de Nlgn1, sería esperable que dichos defectos se encontrasen incrementados en modelos animales con niveles reducidos de Nlgn1. Por el contrario, si Nlgn1 actuase como nucleador sináptico de A β , unos niveles reducidos de Nlgn1 implicarían una mejora en los efectos deletéreos generados por el acúmulo de A β . También existe la posibilidad de que Nlgn1 actuase a dos niveles. En este escenario, Nlgn1 podría posicionar a A β en las sinapsis y que su efecto resultase en un descenso en los niveles de Nlgn1. Por último, los estudios publicados hasta el momento se han limitado al empleo de exposiciones agudas del péptido A β , de manera que se desconoce la relación del sistema Nrxns-Nlgn1 con los

efectos de la expresión crónica de APP y sus metabolitos, un escenario más cercano a la enfermedad.

Para esclarecer los efectos que pudieran tener la interacción de A β con Nlgn1, durante esta tesis doctoral hemos generado nuevos modelos animales que expresan el transgén hAPP751 con la doble mutación *Swedish-London* (KM670/671NL y V7171I) en un contexto de expresión total, parcial o nula de Nlgn1, como se detalla a continuación.

5.1 Generación modelo animal APP_{751SL}; Nlgn1 Thr271fs y caracterización general

Para la generación del modelo animal se cruzaron animales C57/Bl6 APP_{751SL} cedidos por el Dr. Javier Vitorica (Universidad de Sevilla/IBiS), con animales HTZ Nlgn1 Thr271fs, de esta forma obtuvimos animales con la expresión del transgén hAPP751-SL y portadores de la mutación inactivante en Nlgn1. Posteriormente, cruzamos animales APP_{751SL}; HTZ Nlgn1 Thr271fs con animales HTZ Nlgn1 Thr271fs. De estos cruces se obtuvieron los siguientes genotipos: ratones *wild type*, ratones APP_{751SL}, animales APP_{751SL}; Nlgn1^{partial} (expresión de hAPP751-SL en un contexto de expresión parcial de Nlgn1) y animales APP_{751SL}; Nlgn1^{null} (expresión de hAPP751-SL en un contexto de expresión nula de Nlgn1). Además, en estos cruces se obtuvieron ratones HTZ Nlgn1 Thr271fs y HMZ Nlgn1 Thr271fs. Observamos la frecuencia esperada de los distintos genotipos al nacimiento (datos no mostrados).

Como caracterización fenotípica inicial, llevamos a cabo curvas de crecimiento y de supervivencia de los distintos animales. No observamos diferencias en el peso desde los 18 a los 90 días entre ninguno de los 6 genotipos estudiados en machos ni en hembras (Figura 52). El estudio de supervivencia se realizó durante los primeros 120 días de vida. Los animales *wild type* mostraron una supervivencia superior al 80% tanto en machos como en hembras durante este periodo de tiempo. Sin embargo, los animales APP_{751SL} machos mostraron una supervivencia del 60% (Figura 52). Otros autores han encontrado un incremento de la mortalidad causado por muerte súbita en las primeras semanas de vida en animales transgénicos portadores de la mutación *Swedish* en APP y una mutación patogénica en el gen *PSEN1* humano (Y. Huang & Lemke, 2022; Minkeviciene et al., 2009; Tzeng et al., 2018). La supervivencia en animales APP_{751SL}; Nlgn1^{partial} fue del 65% en machos y del 57% en hembras. Los animales APP_{751SL}; Nlgn1^{null} mostraron una

supervivencia aún menor en este rango de tiempo, alcanzando un 40% en machos y un 47% en hembras antes de los 120 días de vida, dándose un inicio más temprano y acelerado de la mortalidad (Figura 52). No se observaron cambios en la mortalidad respecto a animales *wild type* en animales que únicamente expresaban el alelo Nlgn1 Thr271fs (Figura 52). Estos datos indican un efecto negativo de la dosis de Nlgn1 en el índice de supervivencia asociado a la expresión del alelo hAPP751-SL.

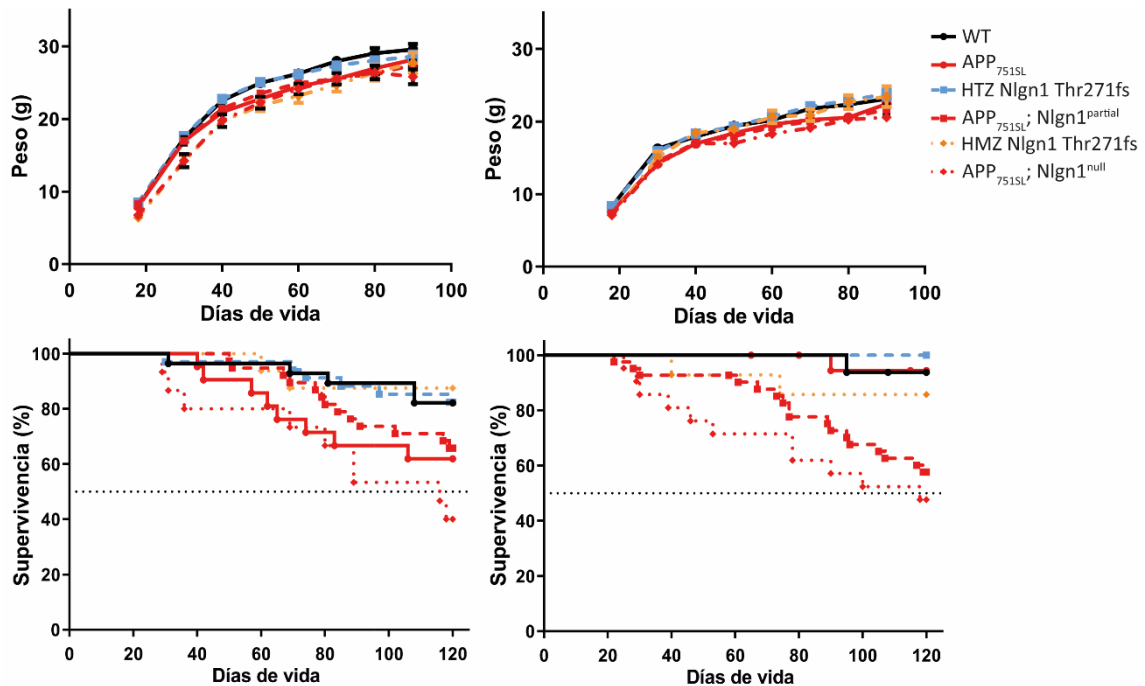


Figura 52. Curvas de peso y supervivencia en animales APP_{751SL}. Arriba, curva de peso de machos (izquierda) y hembras (derecha) desde los 18 días postnatales hasta los 90. N machos = *wild type* 11-29, APP_{751SL}: 8-20, HTZ Nlgn1: 15-35, APP_{751SL}; Nlgn1^{partial}: 16-42, HMZ Nlgn1: 5-13, APP_{751SL}; Nlgn1^{null}: 3-14. N hembras= *wild type* 11-15, APP_{751SL}: 13-23, HTZ Nlgn1: 19-28, APP_{751SL}; Nlgn1^{partial}: 19-38, HMZ Nlgn1: 4-14, APP_{751SL}; Nlgn1^{null}: 5-18. Abajo, curva de supervivencia en animales APP_{751SL} con distintos niveles de Nlgn1 machos (izquierda) y hembras (derecha). La línea discontinua marca el 50% de supervivencia. N machos = *wild type* 28, APP_{751SL}: 21, HTZ Nlgn1: 34, APP_{751SL}; Nlgn1^{partial}: 38, HMZ Nlgn1: 16, APP_{751SL}; Nlgn1^{null}: 15. N hembras= *wild type* 16, APP_{751SL}: 20, HTZ Nlgn1: 28, APP_{751SL}; Nlgn1^{partial}: 41, HMZ Nlgn1: 14, APP_{751SL}; Nlgn1^{null}: 21.

Es interesante destacar que el incremento de mortalidad en los animales APP_{751SL}; Nlgn1^{partial} y APP_{751SL}; Nlgn1^{null} ocurre a una edad temprana en la que no se espera encontrar acúmulo del péptido A β , ya que está descrito que dicho acúmulo sucede principalmente a una edad posterior a los 4 meses en este modelo animal (V. Blanchard et al., 2003). Por tanto, la correlación entre unos menores niveles de Nlgn1 y mayor mortalidad asociada a la expresión de hAPP751-SL podría deberse a un mecanismo independiente del péptido A β .

5.2 Análisis de la expresión de A β en el modelo animal APP_{751SL}; Nlgn1 Thr271fs

Para analizar si los niveles de Nlgn1 podrían afectar de alguna manera a los niveles de los metabolitos de APP *in vivo*, crecimos animales hasta la edad de 13 meses, edad a la que los niveles del péptido A β son fácilmente detectables en el cerebro de ratones APP_{751SL} (J. Blanchard et al., 2009). En experimentos de *Western blot* analizamos los niveles de A β producidos en animales APP_{751SL}, en animales con un 50% de expresión de Nlgn1 (APP_{751SL}; Nlgn1^{partial}) y en ratones con ausencia total de expresión de Nlgn1 (APP_{751SL}; Nlgn1^{null}). Empleamos animales *wild type* como control negativo. Como cabría esperar, no encontramos detección de formas de A β en animales *wild type* mientras que en los animales APP_{751SL} de 13 meses de edad se observó una detección clara de A β aparentemente en forma de monómeros (peso molecular por debajo de los 11 KDa no indicado en la imagen) (Figura 53). La reducción de Nlgn1 al 50 % no parece tener ningún efecto en los niveles de A β , al menos a esta edad. Sorprendentemente, en los animales

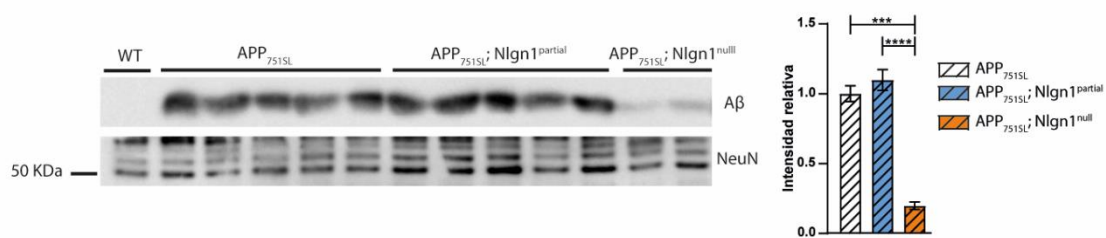


Figura 53. Expresión de A β en animales con diferentes niveles de expresión de Nlgn1. Izquierda, detección de A β en lisados provenientes de hipocampo de animales *wild type*, APP_{751SL}, APP_{751SL}; Nlgn1^{partial} (50% de Nlgn1) o. APP_{751SL}; Nlgn1^{null} (Ausencia total de expresión de Nlgn1.) Se detectó A β empleando el anticuerpo anti- A β (82E1) que detecta las formas solubles y fibrilares de A β . Derecha, se muestra la cuantificación de los niveles relativos de A β respecto a animales APP_{751SL} normalizado por los niveles de NeuN. Análisis estadístico: ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey. *** p<0.001, **** p<0.0001.

con ausencia total de expresión de Nlgn1 pudimos observar una reducción del 80% en la expresión de A β comparada con los animales APP_{751SL} (Figura 53). No encontramos diferencias en los niveles totales de APP en ninguno de los genotipos estudiados respecto a animales APP_{751SL} (datos no mostrados). Estos datos sugieren que Nlgn1 es importante para la formación o mantenimiento del péptido A β en el cerebro.

5.3 Caracterización de la patología A β en el modelo animal APP_{751SL}; Nlgn1 Thr271fs

Algunos de los principales marcadores asociados con la patología A β son los depósitos de A β extracelulares, la fosforilación de la proteína Tau y un aumento en la astrogliosis y astrocitosis (V. Blanchard et al., 2003; Boutajangout et al., 2004; Jimenez et

al., 2008). Tras observar la llamativa reducción de A β en los animales APP_{751SL}; Nlgn1^{null} mediante *Western blot*, decidimos analizar si la distribución, tamaño y número de depósitos extracelulares de A β en el cerebro también se veían afectados por la reducción de Nlgn1. Además, analizamos la astrocitosis, microgliosis y la fosforilación de la proteína Tau en cortes histológicos de cerebro de animales APP_{751SL}; Nlgn1^{null} de 13 meses de edad. Comparamos los resultados obtenidos con animales APP_{751SL} y animales *wild type* de la misma edad.

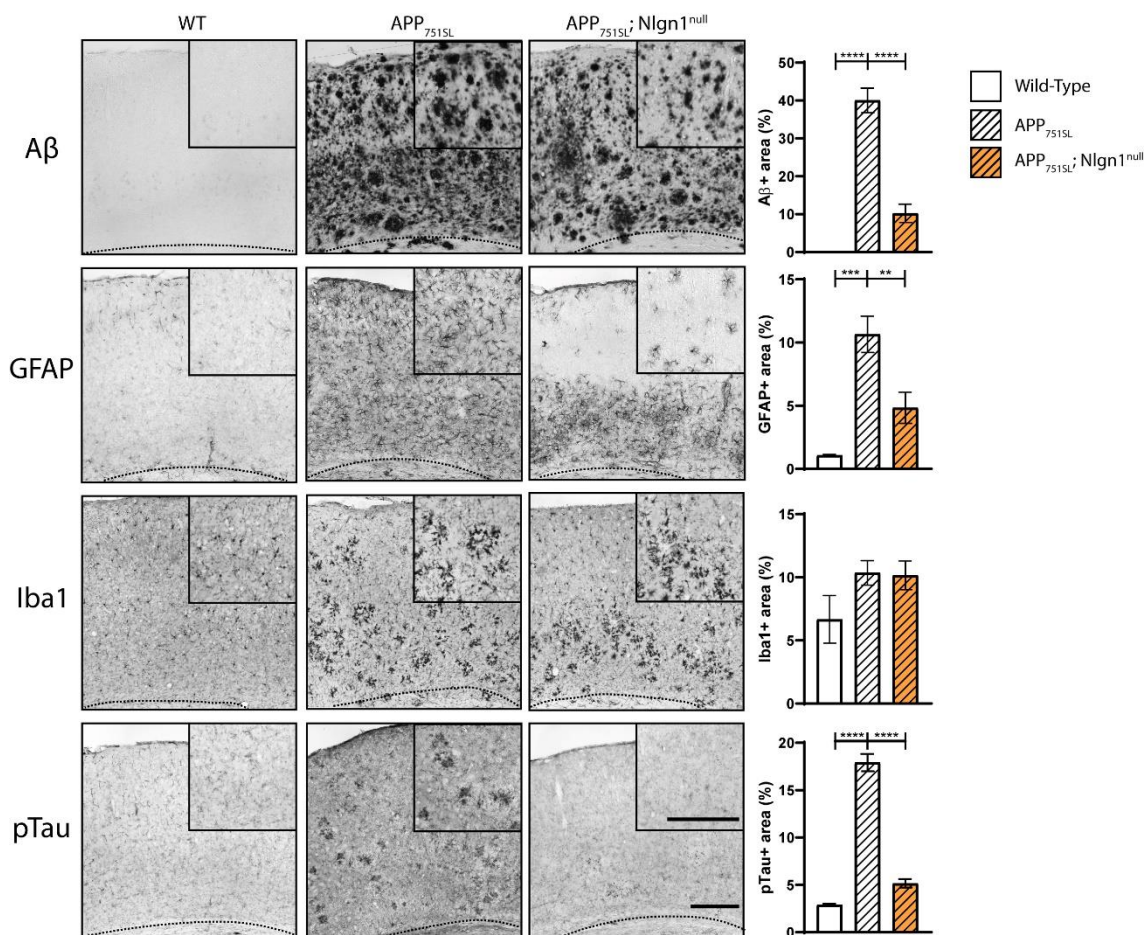
El uso de un anticuerpo anti-A β (OC) que reconoce específicamente los depósitos fibrilares mostró un 40% del área de corteza teñida en animales APP_{751SL}. Sin embargo, en los animales APP_{751SL}; Nlgn1^{null}, este porcentaje se vio reducido a un 10% (*Wild type*: 0.010 \pm 0.006, APP_{751SL}: 40.03 \pm 3.25, APP_{751SL}; Nlgn1^{null}: 10.22 \pm 2.42. Unidades: porcentaje de área teñida por A β \pm SEM) (Figura 54).

El empleo del anticuerpo anti-GFAP reveló un 10% de la corteza ocupada por astrocitos en los animales APP_{751SL}. Este porcentaje se vio reducido a la mitad en los animales APP_{751SL}; Nlgn1^{null} (*Wild type*: 1.074 \pm 0.075, APP_{751SL}: 10.66 \pm 1.43, APP_{751SL}; Nlgn1^{null}: 4.83 \pm 1.23. Unidades: porcentaje de área teñida por anti-GFAP \pm SEM) (Figura 54). Curiosamente, esta reducción se observó especialmente en las capas más externas de la corteza, donde se detectaron células aisladas GFAP⁺ a diferencia de la astrocitosis generalizada que ocurre en los animales APP_{751SL} (Figura 54). Por otro lado, en el análisis de la microglía, encontramos un patrón muy definido en los animales APP_{751SL}, donde se pudo observar una concentración de células Iba1⁺ por toda la corteza en forma circular recordando a la distribución de células microgliales activadas alrededor de las placas de A β descritas previamente por otros grupos (Jimenez et al., 2008). Además, las células Iba1⁺ de los ratones APP_{751SL} mostraron un cambio en la morfología, con somas más grandes y las prolongaciones más cortas y anchas en comparación con animales *wild type* (Figura 54). Las cuantificaciones mostraron un porcentaje de área ocupada por Iba1 similar entre animales APP_{751S} y animales APP_{751SL}; Nlgn1^{null} (*Wild type*: 6.664 \pm 1.888, APP_{751SL}: 10.35 \pm 0.96, APP_{751SL}; Nlgn1^{null}: 10.15 \pm 1.14. Unidades: porcentaje de área teñida por anti-Iba1 \pm SEM) (Figura 54). Por último, analizamos la distribución de la proteína Tau fosforilada (pTau), empleando para ello un anticuerpo específico para esta forma (anti-pTau AT8). En los animales APP_{751SL} encontramos un 17% de la corteza ocupada por pTau siguiendo un patrón circular (Figura 54). Sorprendentemente, en los

animales $APP_{751SL}; Nlgn1^{null}$ el área ocupada por pTau en corteza fue de niveles cercanos a los animales *wild type* (*Wild type*: 2.88 ± 0.132 , APP_{751SL} : 17.91 ± 0.911 , HMZ $Nlgn1$ Thr271fs; APP_{751SL} : 5.16 ± 0.44 . Unidades: porcentaje de área teñida por pTau \pm SEM) (Figura 54).

Una limitación muy importante de estos experimentos es el reducido número de muestras empleadas, que se debió a la mortalidad elevada en los animales HMZ $Nlgn1$ Thr271fs; APP_{751SL} y a la avanzada edad de los ratones.

En conjunto, estos datos sugieren que la ausencia de $Nlgn1$ puede reducir los niveles del péptido $A\beta$ y la distribución de placas en el cerebro, así como la presencia de ciertos marcadores que acompañan a la patología como son la presencia de pTau y el aumento de la astrogliosis. La generación del modelo animal $APP_{751SL}; Nlgn1$ Thr271fs permitirá confirmar estos resultados en un futuro ampliando el número de muestras y las edades de estudio.



V. DISCUSIÓN

Nrxns y Nlgn1 son proteínas de membranas que forman un sistema de señalización trans-sináptico que participa en la regulación de la formación, establecimiento, mantenimiento y función de las sinapsis (Gomez et al., 2021; Krueger et al., 2012; Reissner et al., 2013; Scheiffele et al., 2000; Südhof, 2017). El correcto funcionamiento de los circuitos sinápticos es esencial para el procesamiento de información sensorial cognitiva y motora, así como para el aprendizaje y la memoria. Defectos en el funcionamiento sináptico constituyen las bases patológicas de las enfermedades mentales (Kandel et al., 2013; Kumar et al., 2022; Terry et al., 1991). Alteraciones del complejo Nrxns-Nlgn1 se han asociado originalmente con enfermedades relacionadas con defectos en el neurodesarrollo como autismo y esquizofrenia (Camacho-García et al., 2012, 2013; Jamain et al., 2003; H.-G. Kim et al., 2008; Laumonnier et al., 2004; Lowther et al., 2017; Rabaneda et al., 2014; Südhof, 2008). Sin embargo, aportaciones recientes de nuestro grupo y de otros han extendido el papel de Nrxns-Nlgn1 a enfermedades neurodegenerativas (Bot et al., 2011; Martínez-Mir et al., 2013; Sánchez-Hidalgo et al., 2022; Tristán-Clavijo et al., 2015). En esta Tesis Doctoral hemos profundizado en la implicación del sistema sináptico de Nrxns-Nlgn1 en AD. Para ello, en primer lugar, hemos tratado de esclarecer en un contexto neuronal la compleja interacción entre distintas isoformas de Nrxn1 con isoformas de Nlgn1-2. Por otro lado, hemos desarrollado y/o caracterizado nuevos modelos animales para el estudio de la relación del sistema glutamatérgico de Nrxns-Nlgn1 con factores genéticos y con el envejecimiento asociados a AD. Dentro de los factores genéticos en AD, destacan las mutaciones de pérdida de función en los genes de *PSEN1/2* y las mutaciones en *APP*. Los modelos animales desarrollados en esta Tesis Doctoral han estado encaminados a entender mejor la relación entre la acumulación del sustrato no procesado NrxnCTF con la pérdida de función de PS/ γ -secretasa en AD, así como la pérdida de función de Nlgn1 en los defectos de memoria y la producción del péptido A β en AD. La susceptibilidad del cerebro envejecido a la pérdida de función de PS/ γ -secretasa ha sido otro de los objetivos que hemos modelado experimentalmente en ratones. La validación de estos nuevos modelos animales y los resultados obtenidos han reforzado un papel del sistema de Nrxns-Nlgn1 en la pérdida de función sináptica y de memoria en AD.

1 Interacción entre isoformas de Neurexina1 y Neuroliginas

El estudio de la interacción trans-sináptica de isoformas de Nrns con sus ligandos postsinápticos se ha visto obstaculizado por la falta de herramientas inmunológicas para la detección de isoformas específicas y por el elevado número de isoformas expresadas con alta homología en su secuencia (Dean et al., 2003). Por estos motivos, la interacción de Nrns con Nlgs se ha analizado principalmente en ensayos de interacción *in vitro* de los dominios extracelulares de Nrns y Nlgs, expresados en células no neuronales. Mediante estos estudios se ha propuesto la existencia de un código sináptico modulado por *splicing* alternativo en Nrns y en Nlgs. Así, la inserción en Nlgn1 del sitio B de *splicing* limita la interacción de Nlgn1 a isoformas de β Nrxn1 que carecen del sitio SP4 (Boucard et al., 2005; Chih et al., 2006; Comoletti et al., 2003). A pesar de su relevancia, estos estudios presentan importantes limitaciones. I) la producción de Nrns y Nlgs en células no neuronales carece de las glicosilaciones postraduccionales específicas de neuronas que regulan la interacción de Nrns con sus ligandos (Khalaj et al., 2020). II) La presencia de factores que modulan positiva o negativamente la interacción trans-sináptica de Nrns con Nlgs no está presente en estos ensayos con sistemas heterólogos (Dai et al., 2022; Fan et al., 2021; Singh et al., 2016). III) Existen diferencias entre los mecanismos que median interacción y adhesión, como se demostró con mutaciones en Nlgn1 que impiden la adhesión, pero mantienen la interacción con Nrns (Dean et al., 2003). IV) La interacción de isoformas de Nrns con otros miembros de la familia de Nlgs, como Nlgn2, es menos conocida. Para abordar este problema, hemos desarrollado un sistema que nos ha permitido analizar el reclutamiento presináptico de isoformas concretas de Nrxn1 mediado por Nlgn1 o por Nlgn2 expresadas en la membrana opuesta. Para ello, hemos generado cultivos de neuronas transgénicas que expresan isoformas de α - o β Nrxn1 marcadas con un epítipo Flag en el dominio citoplásmico y analizado su reclutamiento a los terminales presinápticos que contactan de células que expresan Nlgn1 o Nlgn2 en su membrana. Este sistema reproduce con mayor fidelidad las interacciones trans-sinápticas entre isoformas de Nrns con Nlgs en la sinapsis.

Debido a que las interacciones de Nrns con sus ligandos postsinápticos ocurren mediante el dominio extracelular altamente variable de Nrns, razonamos que el marcaje del dominio citoplásmico común permitirá la comparación más precisa entre isoformas.

Tras la correcta inserción en fase de una secuencia para el epítipo Flag en el dominio citoplásmico de α - y β Nrxn1, comprobamos en experimentos de *Western blot* que el marcaje en el dominio citoplásmico no afecta al patrón general de expresión de las proteínas. La detección de bandas de mayor peso molecular que el previsto para el núcleo proteico fue consistente con una glicosilación normal de las correspondientes isoformas.

A continuación, generamos construcciones lentivirales para poder expresar cuatro isoformas relevantes de Nrxn1: α - y β Nrxn1 con y sin el sitio de *splicing* 4. Los vectores lentivirales empleados contienen el promotor de sinapsina, que dirigen la expresión exógena específicamente en neuronas, evitando de esta manera las células vecinas no neuronales (Gascón et al., 2008). Los bajos niveles de expresión relativa obtenidos con el promotor de sinapsina proporciona una ventaja adicional, ya que reduce los posibles problemas de deslocalización frecuentemente asociados a la sobreexpresión. Cabe resaltar que los experimentos de interacción *in vitro* han demostrado que el sitio SP4 regula de forma relativa, no absoluta, la interacción con Nlgn1, por lo que este papel modulador del sitio SP4 podría verse oscurecido por altos niveles de expresión.

Realizamos infecciones lentivirales en cultivos neuronales de corteza para conseguir una expresión generalizada en las neuronas del cultivo de α - y β Nrxn1 con y sin SP4. Días más tarde tras la infección, los cultivos infectados se co-cultivaron con células no neuronales que expresan Nlgn1 o Nlgn2 etiquetadas con el epítipo VSV. Analizamos el reclutamiento de las isoformas de Nrxn1 en los axones que contactan las células transfectadas con Nlgn1 o Nlgn2 mediante inmunofluorescencia. Como resultado de estos experimentos, observamos que las isoformas de α Nrxn1 con y sin el SP4 se reclutaron mínimamente por las células HEK 293T que expresan Nlgn1. Sin embargo, la expresión de Nlgn2 en la membrana opuesta indujo un reclutamiento presináptico de α Nrx1, preferentemente de la isoforma de *splicing* que carece del SP4.

Por otro lado, observamos que Nlgn1 produjo un reclutamiento evidente de las isoformas de β Nrxn1, y que la presencia del SP4 en β Nrxn1 modulaba a la baja su reclutamiento. Además, encontramos que Nlgn2 reclutó β Nrxn1 a los terminales presinápticos con un patrón similar al inducido por Nlgn1, es decir, un reclutamiento máximo para β Nrxn1 Δ 4 y mínimo para β Nrxn1SP4.

Estos datos indicaron que las isoformas de β Nrxn1 son receptores presinápticos de para Nlgn1 y para Nlgn2, mientras que α Nrxn1 se recluta preferentemente por Nlgn2. La presencia de SP4 tuvo un factor modulador negativo.

Para analizar la interacción de isoformas de Nrxn1 con Nlgn1 en un contexto totalmente neuronal, modificamos nuestro sistema experimental. Para ello, transfectamos con VSV-Nlgn1 cultivos de corteza que expresaban las diferentes isoformas de Nrxn1 mediante infección lentiviral. Debido a la baja eficiencia de transfección, se consigue la expresión de Nlgn1 en neuronas individuales que se encuentran rodeadas de axones que expresan la isoforma de Nrxn1 correspondiente mediante infección viral. El reclutamiento axonal de las isoformas de Nrxn1 a las dendritas que expresan Nlgn1 se analizó por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Flag y anti-VSV, respectivamente. En estos experimentos confirmamos el reclutamiento selectivo de las isoformas de β Nrxn1 por Nlgn1, mientras que las isoformas de α Nrxn1 no se concentraban en dichos terminales. La inserción de SP4 moduló a la baja el reclutamiento de β Nrxn1 por Nlgn1. Además, la expresión de β Nrxn1 Δ 4 incrementó la capacidad sinaptogénica y la formación de espinas dendríticas inducida por Nlgn1, indicando que dicha interacción tiene efectos funcionales.

Estos datos pueden tener consecuencias importantes. Nlgn1 y Nlgn2 tienen una localización y función específicas en sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas, respectivamente (Graf et al., 2004; Irie et al., 1997; Pouloupoulos et al., 2009; Song et al., 1999; Varoqueaux et al., 2004). La interacción selectiva de Nlgn1 con β Nrxns indica un papel relevante de isoformas de β Nrxn en sinapsis glutamatérgicas. Por otra parte, la interacción de α Nrxns con Nlgn2 sugiere una función de α Nrxns en sinapsis GABAérgicas (Figura 55). La función de α Nrxns en sinapsis inhibitorias se ve apoyada por los datos obtenidos por otros grupos en el ratón triple *KO* de los tres genes codificantes de α Nrxns, pero que mantienen la expresión de β Nrxns conservada. Estos animales mostraron una reducción al 50% de las sinapsis GABAérgicas respecto a animales controles, sin embargo, el número de sinapsis glutamatérgicas se mantuvo inalterado (Missler et al., 2003). En el contexto de enfermedad mental, se han descrito mutaciones y deleciones en el gen *NRXN1* en pacientes de autismo y esquizofrenia. Estas mutaciones afectan a secuencias específicas de las isoformas α Nrxn1 y β Nrxn1 o a secuencias comunes de las dos isoformas (Camacho-Garcia et al., 2012, 2013; Ching et al., 2010; Dabell et al., 2013;

Gauthier et al., 2011; Tromp et al., 2021; Wiśniowiecka-Kowalnik et al., 2010). La identificación de estas mutaciones podría sugerir que la disfunción de Nrnx1 en enfermedades del neurodesarrollo actúe a través de un mecanismo común que afecte a la función de α - y β Nrxn. Sin embargo, otros datos del grupo han mostrado la formación de un complejo de β Nrxn con Nlgn1, pero no con Nlgn2, en ensayos de inmunoprecipitación en un modelo animal de autismo que expresa un mutante de β Nrxn (Rabaneda et al., 2014). Por tanto, nuestros datos apuntan a una posibilidad alternativa en la que mutaciones que afectaran la secuencia de α Nrxn1 actuaran principalmente a través de ligandos comunes, como Nlgn2 en sinapsis GABAérgicas; mientras que mutaciones en secuencias de β Nrxn1 podrían afectar la función de Nlgn1 en sinapsis glutamatérgicas. Además, el desarrollo de este sistema celular permitirá analizar en un contexto neuronal el reclutamiento de isoformas de Nrnx1 por otros miembros de Nlgn, como Nlgn3 y Nlgn4, cuyos genes se han encontrado mutados en pacientes de autismo (Jamain et al., 2003; Laumonnier et al., 2004; Yan et al., 2005).

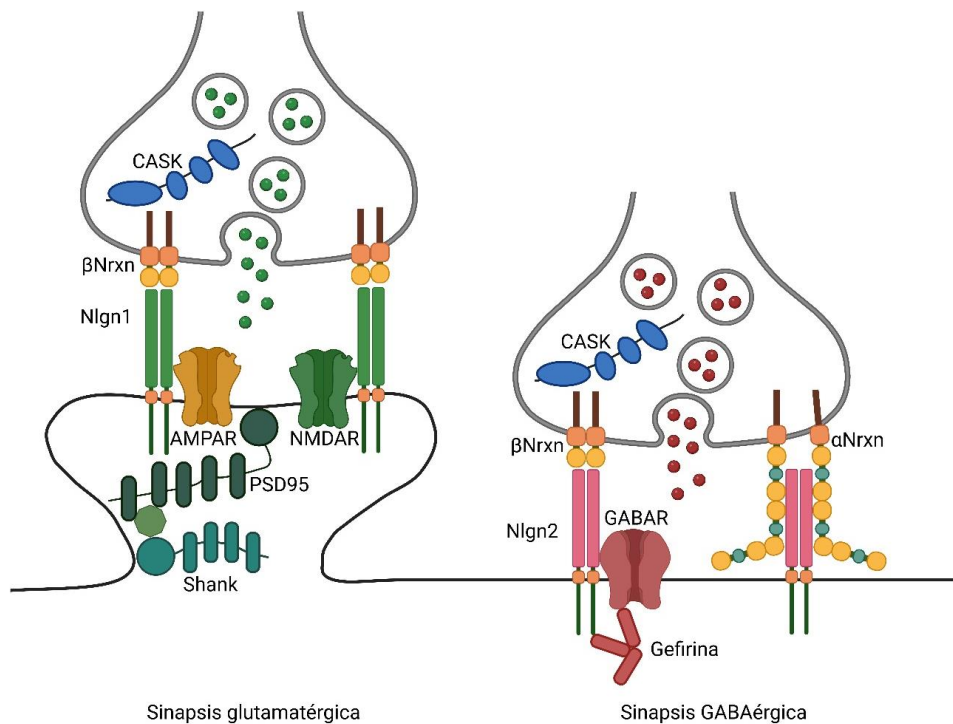


Figura 55. Interacción Nrnx-Nlgn en distintos tipos de sinapsis. Esquema representativo de la interacción de α Nrxn y β Nrxn con Nlgn1 y Nlgn2 en sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas. Figura realizada con biorender.com

2 Análisis de la pérdida de función de Presenilina durante el envejecimiento del cerebro

Mutaciones en los genes de *PSEN1/2* son las causas mayoritarias de la FAD (Kumar et al., 2022; Long & Holtzman, 2019; Scheltens et al., 2021). El patrón de herencia autosómica dominante en las mutaciones en *PSEN1/2* asociadas con FAD, la localización de dichas mutaciones a lo largo de toda la secuencia de la proteína y la caracterización *in vitro* e *in vivo* de numerosas de las mutaciones indican que la pérdida de función en PS y, por tanto, del complejo γ -secretasa, actúa como mecanismo iniciador en la FAD (Beglopoulos et al., 2004; Kabir et al., 2020; Saura et al., 2004; Sun et al., 2017). Sin embargo, encontramos una serie de aspectos de relevancia clínica aún sin respuesta. Una primera pregunta es la identificación funcional del sustrato, o sustratos, de PS que median los defectos sinápticos y de memoria causados por mutaciones de pérdida de función de PS. Una segunda cuestión es la clarificación del papel del envejecimiento en este proceso. Las respuestas a estas preguntas pueden tener una relevancia clínica importante, ya que permitirían identificar, por una parte, sustratos con interés farmacológico y, por otra, etapas del envejecimiento con una susceptibilidad diferencial a la pérdida de función de PS. Durante esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la caracterización inicial de dos nuevos modelos animales generados en el grupo que tratan de responder a estas preguntas: ratones que presentan un incremento en los niveles de un sustrato relevante de PS, NrxnCTF, en un contexto general de pérdida de función de PS y ratones con un control temporal de la escisión de *Psen1* en el cerebro durante el envejecimiento.

Incluso los portadores de mutaciones en *PSEN1* causantes de FAD desarrollan los síntomas tras las primeras décadas de vida. Hay dos posibilidades que pueden explicar esta dependencia temporal de la aparición de síntomas. Por un lado, la existencia de un mecanismo de progresión relativamente lento durante una fase asintomática que, una vez superado un determinado umbral patogénico, culmina con la aparición de los síntomas. Por otro lado, la existencia de una mayor sensibilidad a la falta de función de PS durante el envejecimiento que coincida con la aparición de síntomas.

Los modelos actualmente generados carecen de la capacidad de controlar temporalmente la pérdida de función de PS. El modelo de pérdida de función de PS más

ampliamente estudiado son los animales PScKO. Para evitar la muerte perinatal que se produce en los animales *Psen1* KO convencionales (Shen et al., 1997), en los animales PScKO la escisión de *Psen1*, sobre un fondo PS2^{-/-}, ocurre en neuronas glutamatérgicas del prosencéfalo a un mes de vida inducida por la actividad Cre dirigida por el promotor CaMKII (Saura et al., 2004). Para poder tener control temporal de la escisión de *Psen1*, en el grupo hemos empleado el sistema inducible por tamoxifeno que utiliza la proteína CreERT2 bajo la expresión del promotor CaMKII sobre un fondo PS2^{-/-}, resultando en la generación de los animales PScKO^{temp}. De esta manera, se produce la escisión de *Psen1* tras la administración en la dieta de tamoxifeno en las mismas neuronas del prosencéfalo que en los animales PScKO. Sin embargo, la administración de tamoxifeno ofrece un control temporal de la escisión de *Psen1* en cualquier momento del envejecimiento.

Como primera validación del modelo, observamos que los niveles de PS1 descendían drásticamente en la corteza y en el hipocampo de animales tratados con tamoxifeno en el primer mes de vida y a los 7 meses, ratones PScKO^{young} y en ratones PScKO^{adult} respectivamente. Actualmente hay más de 150 sustratos distintos de PS/ γ -secretasa descritos. En modelos de pérdida de función de PS, ya sea por escisión génica, como en los animales PScKO (Saura et al., 2004), o por la presencia de mutaciones de pérdida de función en el gen *PSEN1* (Xia et al., 2015), se produce un acúmulo de los fragmentos CTFs de los sustratos de PS. Para validar funcionalmente los modelos animales PScKO^{young} y PScKO^{adult} analizamos la acumulación de sustratos relevantes de PS/ γ -secretasa. Seleccionamos sustratos ampliamente estudiados en el contexto de pérdida de función neuronal de PS, como APP y N-Cadherina (V. Blanchard et al., 2003; de Strooper et al., 1998; Marambaud et al., 2003; Philippe Marambaud et al., 2002) junto a sustratos de PS neuronales cuyo procesamiento ha sido descrito más recientemente y son de especial relevancia para el grupo, Nrnx y Nlgn1 (Peixoto et al., 2012; Saura et al., 2011; Suzuki et al., 2012). En lisados de hipocampo y corteza de animales PScKO^{young} y PScKO^{adult} observamos un incremento en los fragmentos CTFs seleccionados, sin que se afectaran los niveles de las correspondientes proteínas maduras. Es interesante destacar que, a pesar de la diferencia de edad en los animales, 7 meses en los ratones PScKO^{young} y 13 meses en los ratones PScKO^{adult}, en el momento del análisis llevaban el mismo tiempo tras la escisión de *Psen1*, y el acúmulo observado de los diferentes CTFs fue similar en ambas estructuras cerebrales.

Para la caracterización funcional del modelo animal, se determinaron marcadores de neurodegeneración en animales PScKO^{young} a los 7, 13 y 18 meses. Estas edades se seleccionaron ya que permitían la comparación con los datos descritos por otros grupos para los animales PScKO, en los que la escisión de *Psen1* ocurre en el primer mes de vida (Saura et al., 2004; Watanabe et al., 2014; Wines-Samuelson et al., 2010). La tinción de cortes coronales de cerebro con NeuN reveló una disminución progresiva del grosor de corteza respecto a animales controles desde un 16% a la edad de 7 meses, hasta un 38% a la edad de 13 meses donde parece estabilizarse. Esta reducción del grosor cortical no se vio acompañada de cambios en la densidad neuronal. Por otro lado, observamos una astrogliosis abundante en la corteza de los animales PScKO^{young} revelada por un incremento del área ocupada por células GFAP⁺. Este incremento de la astrogliosis parece progresivo con la edad, pasando de 1.7 veces la presencia de astrocitos en corteza respecto a animales controles a los 7 meses, hasta 4.7 veces a la edad de 18 meses. Los datos de astrogliosis en hipocampo no alcanzaron significancia estadística a la edad de 18 meses, presumiblemente, por la abundancia de los niveles basales de GFAP en el hipocampo de animales controles (Watanabe et al., 2014). Por último, el análisis de la presencia de microglía mediante un análisis de densidad de células Iba1 positivas reveló un incremento en los animales PScKO^{young} de 3 veces respecto de animales controles, incremento que se mantuvo en las edades más tardías analizadas. Sin embargo, el análisis de porcentaje de área teñida por Iba1 sí reveló un incremento progresivo con la edad, pasando del 30% a la edad de 7 meses hasta un incremento de 2.3 veces a la edad de 18 meses. Este incremento en el área teñida parece estar asociado con el cambio en morfología que sufren las células microgliales en los animales PScKO^{young}, pasando a tener unos somas más gruesos y unas ramificaciones más cortas y gruesas. En el hipocampo, la densidad de células Iba1⁺ parece mantenerse estable con la edad a partir de los 7 meses, manteniendo un incremento de 3 veces respecto a los animales controles.

La comparación de estos datos con los datos publicados en los animales PScKO mostró que la pérdida en el grosor de corteza observada en los ratones PScKO^{young} a los 13 meses de edad del 38% fue de magnitud muy similar a la pérdida del 35% de volumen cortical descrita en los animales PScKO a los 9 meses. Además, el incremento observado en la astrogliosis y microgliosis en los animales PScKO^{young} de 18 meses de edad de 4.7 y 2.7 veces, respectivamente, es de magnitud comparable, aunque algo más reducida, que

las observadas en los ratones PScKO de 16 meses de edad. Estos datos muestran que la pérdida de función de PS inducida por la administración de tamoxifeno en los animales PScKO^{young} genera una reducción en el grosor de corteza, astrogliosis y microgliosis de magnitud similar a los descritos en los animales PScKO. En conjunto, el descenso en los niveles de PS1 observado, el acúmulo de los fragmentos CTFs sustratos de PS junto con la aparición de marcadores de neurodegeneración en animales PScKO^{young} a niveles similares a los descritos previamente en los ratones PScKO, nos han llevado a concluir que podemos reproducir la pérdida de función de PS en el ratón PScKO^{temp} con control temporal inducido por tamoxifeno.

Una vez validado el modelo animal PScKO^{temp} decidimos emplear el sistema de inducción por tamoxifeno para estudiar los efectos de una pérdida de función de PS en edades más avanzadas. Para ello, animales PScKO^{temp} recibieron tamoxifeno a los 7 meses (animales PScKO^{adult}) y se crecieron hasta los 13 meses. En cortes coronales del cerebro de estos animales, realizamos el mismo abordaje de tinción y cuantificación de experimentos de inmunohistoquímica empleado previamente en los animales PScKO^{young}. De esta manera, hemos podido comparar los efectos producidos por una falta de función de PS de la misma duración de 6 meses, pero con dos edades de inicio distintas, a un 1 mes y a 7 meses.

En los ratones PScKO^{adult} observamos un descenso en el grosor de corteza ligeramente más acentuado que en los animales PScKO^{young}, pasando de un 16% a un 20%, respectivamente. El área ocupada por células GFAP⁺ fue ligeramente superior en los animales PScKO^{adult}, pasando de un incremento de 1.7 veces en los animales PScKO^{young} a un incremento de 2.17 en los ratones PScKO^{adult}. Sin embargo, el análisis de la microgliosis cortical no pareció revelar un incremento derivado de la pérdida de función de PS en la edad adulta del animal, sufriendo los animales PScKO^{adult} un incremento de 2.17 veces respecto a los controles y los animales PScKO^{young} un incremento de 3 veces respecto a animales controles.

En conjunto, estos datos indican que la pérdida de función de PS en la edad adulta del animal produce una pérdida en el grosor de corteza y astrogliosis incrementados cuando se comparan con animales en los que la pérdida de función de PS ocurrió a una edad temprana. Esta observación inicial parece indicar que existen eventos concretos causados por la pérdida de función de PS que se puedan ver afectados por el momento

del envejecimiento en el que ocurre. Una observación interesante derivada de estos experimentos es que la pérdida del grosor de corteza en animales PScKO^{young} en el intervalo de 1 a 7 meses fue del 16% que incrementó a un 38% a la edad de 13 meses. Estos datos suponen una reducción en la corteza de los ratones PScKO^{young} del 16% en el intervalo de 1 a 7 meses y del 22% en el intervalo de los 7 a los 13 meses. El porcentaje de reducción de corteza en el intervalo de edad desde los 7 a los 13 meses observado en los animales PScKO^{adult} fue del 20%. Estos datos parecen indicar que la mayor neurodegeneración cortical observada en el periodo de 7 a 13 meses en los animales PScKO^{temp} no es consecuencia directa de un periodo previo de ausencia de función de PS, sino de un punto concreto del envejecimiento que parece ser más sensible a esta falta de función.

Los ensayos en los animales PScKO^{adult} forman parte de un abordaje experimental más extenso (Figura 30). En el grupo estamos completando la obtención y caracterización de animales PScKO^{old}. De esta manera, se podrá comparar las consecuencias de una pérdida de función de PS de la misma duración, pero iniciada a tres edades distintas, joven (1 mes), adulto (7 meses) y viejo (12 meses).

De igual manera, sería interesante en experimentos futuros la inclusión de otros marcadores cuantificables asociados con la pérdida de función de PS, por ejemplo, el estudio de la hiperfosforilación de la proteína Tau. Se ha mostrado una intensa hiperfosforilación de Tau en experimentos de *Western blot* empleando lisados provenientes de animales PScKO a los 9 meses de edad (Saura et al., 2004). Otro factor de estudio relevante es el análisis de densidad de espinas dendríticas. Mediante la tinción de Golgi-Cox, se ha descrito una pérdida de la arborización dendrítica y de la densidad de espinas dendríticas en neuronas de la región CA1 del hipocampo de animales PScKO de 9 meses (Saura et al., 2004). Un último factor sería el estudio de la apoptosis y muerte neuronal. Otros grupos han realizado análisis de la presencia de células positivas para caspasa-3 y -9 activadas y ensayos de *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling* (TUNEL) en animales PScKO. Estos grupos encontraron un incremento significativo de las células positivas para caspasa-3 y -9 activadas en la corteza de animales PScKO de 2 y 4 meses de alrededor de 2 veces las presentes en animales controles. Por otro lado, reportaron un incremento significativo de entre 7 y 15 veces de células TUNEL⁺ en la corteza de animales PScKO del mismo rango de edad

(Watanabe et al., 2014; Wines-Samuelson et al., 2010). En conjunto, la validación funcional del modelo PS κ CO regulable por tamoxifeno, la escisión de *Psen1* en tres puntos distintos durante el envejecimiento, junto con el estudio de un número de marcadores cuantificables asociados con neurodegeneración, astrogliosis, microgliosis y muerte celular, nos permitirá determinar cómo afecta el envejecimiento en la pérdida de función de PS. Sin embargo, podría ocurrir que en estos estudios no se observaran diferencias significativas en ninguno de los marcadores analizados. Aunque un resultado negativo, estos datos indicarían que el fenotipo neurodegenerativo ocurre en la misma magnitud con independencia de la edad de inicio de la pérdida de función de PS, un resultado en sí mismo relevante. El análisis posterior de las rutas y sustratos alterados en las muestras de estos animales nos permitirá concluir la existencia, o no, de mecanismos responsables coincidentes.

3 Impacto del acúmulo específico de NrxnCTF.

Como se ha indicado anteriormente, un factor relevante en el estudio de la falta de función de PS es la identificación de sustratos de PS/ γ -secretasa concretos que produzcan los defectos sinápticos, de memoria y neurodegenerativos asociados con AD. Estudios previos del grupo han sugerido que las Nrxns pueden ser uno de los sustratos relevantes que medien los defectos sinápticos y de memoria ocasionados por una falta de función de PS. La pérdida de función de PS por mutaciones asociadas a FAD o mediante abordajes farmacológicos o genéticos impide el correcto procesamiento de Nrxns, llevando a la acumulación del sustrato de PS, NrxnCTF, en el terminal presináptico *in vitro* e *in vivo* (Sánchez-Hidalgo et al., 2022; Saura et al., 2011; Servián-Morilla et al., 2018). La acumulación del NrxnCTF en los terminales presinápticos de neuronas glutamatérgicas en los animales PS κ CO es un evento que ocurre a una edad temprana que coincide con defectos en plasticidad sináptica y de memoria (Saura et al., 2011). Además, el acúmulo específico de NrxnCTF, sin afectar al resto de sustratos de PS, produce defectos en la liberación de neurotransmisor, en plasticidad presináptica y en memoria asociativa (Sánchez-Hidalgo et al., 2022; Servián-Morilla et al., 2018). Estos datos nos han llevado a sugerir que NrxnCTF es un buen candidato para mediar los defectos asociados a la pérdida de función de PS en FAD. La acumulación de NrxnCTF en el terminal presináptico

podría competir con ligandos sinápticos que se unan al dominio citoplásmico de Nrns en el mismo terminal, desestabilizando así el correcto entramado proteico necesario para la liberación de neurotransmisor. En este sentido, hemos demostrado que NrnsCTF interactúa con CASK, una proteína que forma un complejo con Nrns que interviene en la liberación de neurotransmisor (Serván-Morilla et al., 2018; Butz et al., 1998). También existe la posibilidad hipotética de que la acumulación de NrnsCTF actúe de manera transsináptica, alterando la interacción de Nrns con ligandos postsinápticos, como Nlgn3. Por tanto, los trabajos del grupo han demostrado un papel perjudicial de la acumulación de NrnsCTF en AD. La identificación de sustratos específicos de PS es un paso esencial para la identificación de dianas terapéuticas, pero es necesario tener en cuenta que la pérdida de función de PS en FAD desencadena el procesamiento incorrecto de sus numerosos sustratos, no de un único sustrato. Esto podría tener importantes consecuencias en la patología. Por un lado, el efecto deletéreo de un CTF determinado podría verse modulado al alza por la acumulación de los fragmentos CTFs de otros sustratos generados en paralelo. Por otro lado, podría ocurrir que, aunque el acúmulo selectivo de un fragmento CTF concreto no tuviera por sí mismo un efecto determinado, la combinación con otros sustratos resultara en la aparición de dicho efecto.

Para poder analizar la posible interacción de NrnsCTF con otros sustratos de PS/ γ -secretasa, hemos incrementado los niveles de NrnsCTF en un contexto de pérdida general de función de PS. Los animales PScKO;NrnsCTF (PS1^{ff}; PS2^{-/-}; CaMKII-CreERT2; CaMKII-HA-NrnsCTF) se diseñaron para inducir la expresión transgénica de NrnsCTF en las mismas neuronas glutamatérgicas del prosencéfalo adulto carentes de actividad de PS en los animales PScKO. Realizamos una caracterización bioquímica de la expresión del transgén HA-NrnsCTF y del estado del procesamiento de otros sustratos relevantes de PS en animales PScKO;NrnsCTF. Observamos que la expresión del transgén HA-NrnsCTF era indetectable en los animales simples transgénicos CaMKII-HA-NrnsCTF. Sin embargo, el transgén NrnsCTF se detectó en los animales PScKO;NrnsCTF. La explicación más plausible de estos resultados es que la presencia de actividad de PS impide la acumulación de NrnsCTF en los ratones CaMKII-HA-NrnsCTF, mientras que la pérdida de función de PS resulta en el acúmulo de NrnsCTF en los animales PScKO;NrnsCTF. Estos datos suponen, además, una confirmación adicional de que NrnsCTF es un sustrato *in vivo* de PS. Mediante el empleo del anticuerpo Pan-Nrns observamos un incremento total de

NrxnCTF en los animales PScKO;NrxnCTF que proviene de la suma de la acumulación de NrxnCTF endógeno y de HA-NrxnCTF transgénico.

Se han identificado dos sitios de procesamiento del ectodominio en Nrxn1 y Nrxn3, sugiriendo la existencia de dos sitios de corte, uno mayoritario cercano al segmento transmembrana, y otro minoritario situado al N-terminal de éste (Borcel et al., 2016; Servián-Morilla et al., 2018). La detección de una única banda producida por el transgén HA-NrxnCTF podría indicar que la secuencia codificada por este transgén comienza a partir del residuo producido por el sitio de corte mayoritario y que carece del segundo sitio de procesamiento.

Por otro lado, el análisis de otros sustratos de PS, como APP y N-Cadherina, determinó que el acúmulo de sus correspondientes CTFs se produce en los animales PScKO;NrxnCTF a niveles comparables a los detectados en los animales PScKO^{young}. De esta manera, demostramos que en los ratones PScKO;NrxnCTF se produce un incremento específico de NrxnCTF en un contexto de pérdida de función de PS, sin afectar de forma general la acumulación de otros sustratos. A continuación, estudiamos la localización celular del transgén HA-NrxnCTF mediante experimentos de inmunohistoquímica en cortes coronales de cerebro. Detectamos expresión de HA-NrxnCTF en regiones de corteza e hipocampo, entre las que destacó una intensa tinción positiva en una región del hipocampo preferentemente presináptica, el *stratum lucidum*, donde HA-NrxnCTF se concentró en los axones que provienen del giro dentado hacia la región CA3. Esta localización aparentemente presináptica concuerda con la localización observada *in vivo* para NrxnCTF en nuestros trabajos previos mediante experimentos de *Western blot* (Sánchez-Hidalgo et al., 2022; Saura et al., 2011). El patrón de expresión del transgén NrxnCTF en este contexto de pérdida de función de PS puede reflejar regiones concretas del cerebro donde el procesamiento de Nrxns por PS sea más relevante.

A continuación, pasamos a estudiar si el incremento en NrxnCTF modula los efectos causados por la pérdida de función de PS. Analizamos cortes de cerebro de animales PScKO;NrxnCTF de 13 meses de edad para estudiar marcadores de neurodegeneración, astrogliosis y astrocitosis ya observados en los animales PScKO^{young}. Los datos obtenidos indican que el incremento en los niveles de NrxnCTF parece tener un leve efecto negativo en la densidad neuronal en corteza, donde detectamos una reducción de la densidad de células NeuN⁺ del 12% respecto a animales PScKO^{young}. El resto de los marcadores

estudiados, como el grosor de corteza, astrogliosis y microgliosis, no se vieron afectados por el incremento de NrnxCTF en los animales PScKO;NrnxCTF de 13 meses. Si bien el efecto observado en densidad neuronal va en consonancia con el papel de NrnxCTF en el mismo tipo celular, es necesario realizar nuevos análisis. Un punto interesante para modificar en futuros experimentos es la edad de los animales estudiados. En esta Tesis Doctoral se han comparado animales PScKO^{young} y PScKO;NrnxCTF de 13 meses de edad. Es posible que en esta edad la patología producida por la pérdida de función de PS sea ya tan avanzada que oculte el posible efecto modulador del incremento en NrnxCTF, por ello que sería interesante analizar animales más jóvenes. En animales PScKO^{young} de 7 meses la pérdida del grosor de corteza, la astrogliosis y la microgliosis no alcanzan niveles tan altos, por tanto, podría ser un contexto más favorecedor para detectar una posible modulación al alza de los síntomas provocada por. Por el contrario, podría ocurrir que un mayor tiempo de incremento en los niveles de NrnxCTF llevaran a la aparición de una sintomatología más acusada. Para comprender mejor el papel de NrnxCTF, en futuros experimentos se analizarán ratones PScKO;NrnxCTF de 7 y 18 meses y se compararán con los datos obtenidos en animales de 13 meses de edad.

En conjunto, hemos generado un nuevo modelo animal de pérdida de función de PS inducible por tamoxifeno, los animales PScKO^{temp} (Figura 56). La caracterización bioquímica e histológica del modelo indican el correcto funcionamiento de la aproximación, con la consecuente pérdida de función de PS y la aparición de marcadores neurodegenerativos a niveles similares a los descritos en los ratones PScKO. El control temporal de la actividad Cre con tamoxifeno en neuronas del prosencéfalo nos ha permitido iniciar el estudio de las consecuencias asociadas a una pérdida de función de PS en la edad adulta y su comparación con la pérdida de función de PS desde una edad temprana postnatal. Los datos iniciales han detectado un ligero incremento en la pérdida del grosor de corteza y en la presencia de astrogliosis cuando la pérdida de función de PS se inicia en la edad adulta. Por otra parte, la generación de un modelo animal que incrementa selectivamente la acumulación de NrnxCTF en un contexto de pérdida general de función de PS (Figura 56) nos ha permitido iniciar la contribución específica del procesamiento impedido de Nrnxns con síntomas asociados a AD. Hemos observado un ligero impacto negativo sobre la densidad neuronal, sin afectar la pérdida del grosor de corteza, la astrogliosis y la microgliosis ya generados por la falta de función de PS, al

menos en la edad estudiada. En un futuro, ampliaremos el rango de edad de estudio y las aproximaciones experimentales aprovechando las ventajas del modelo PS*ScKO*;NrxnCTF.

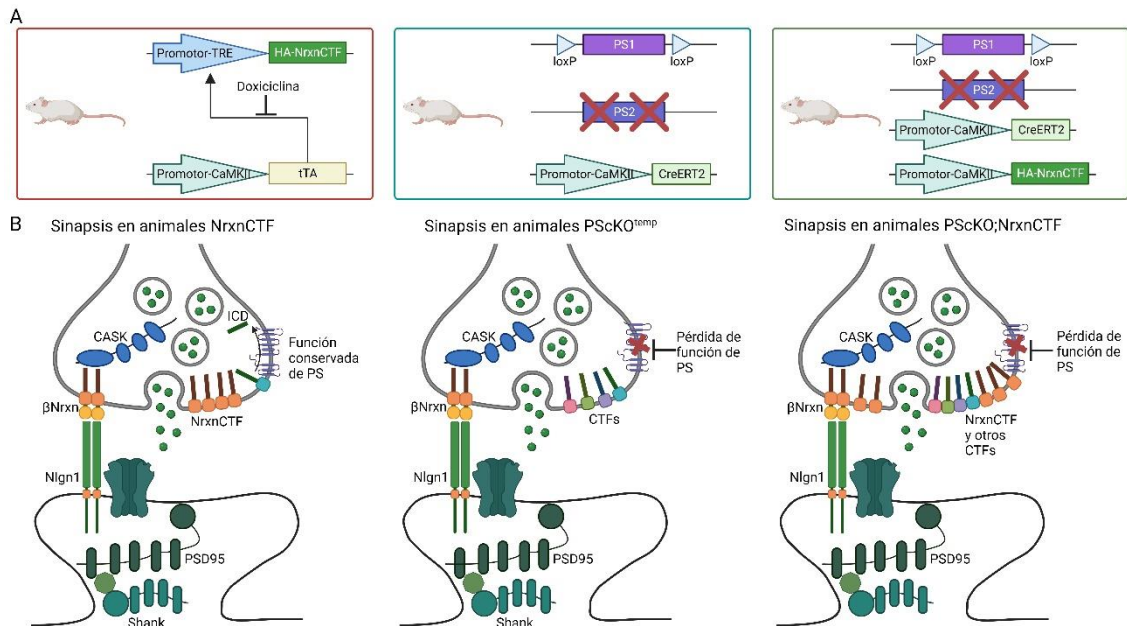


Figura 56. Comparación de los modelos de estudio generados por el grupo. A.- Representación de los genotipos en los diferentes modelos animales. **B.-** Esquema representativo de la sinapsis en cada uno de los modelos animales. De izquierda a derecha: Ratones NrxnCTF previamente generados en el grupo (Sánchez-Hidalgo et al., 2022). La función de PS se encuentra conservada y se consigue la expresión exógena de NrxnCTF. Ratones PS*ScKO*^{temp}, conseguimos el control temporal de la función de PS. Ratones PS*ScKO*;NrxnCTF, en estos animales se combina la pérdida de función de PS con el acúmulo exógeno de NrxnCTF.

4 Análisis del modelo animal Knockin Nlgn1 Thr271fs, los efectos de una mutación asociada a la enfermedad de Alzheimer

En pacientes con autismo se han identificado mutaciones inactivantes y truncantes en *NLGN3* y *NLGN4* (Jamain et al., 2003; Laumonier et al., 2004; Yan et al., 2005). Sin embargo, la implicación de Nlgn1 en enfermedades mentales es menos conocido, a pesar de su papel en sinapsis glutamatérgicas y la abundancia relativa de Nlgn1 comparado con otros miembros de la familia de Nlgn (Jamain et al., 2008; Nakanishi et al., 2017; Song et al., 1999). Por ello, la identificación por primera vez de una mutación truncante en heterocigosis en *NLGN1* en una paciente con AD sugirió la posibilidad de que una pérdida parcial de función de Nlgn1 pudiera provocar alteraciones en la función sináptica y en la memoria en AD (Tristán-Clavijo et al., 2015). Como continuación del proyecto, en el grupo se generó el modelo animal KI Nlgn1 Thr271fs empleando tecnología TALENS. Durante

esta Tesis Doctoral se ha realizado la caracterización bioquímica y conductual en detalle del modelo animal.

La mutación *NLGN1* Thr271fs genera un codón de *STOP* prematuro que impide la expresión de la proteína Nlgn1 madura pudiendo resultar en la producción de un fragmento N-terminal. Mediante experimentos de *Western blot* se ha confirmado la ausencia de Nlgn1 expresada por el alelo *Nlgn1* Thr271fs en el cerebro de los animales. Sin embargo, el fragmento N-terminal de Nlgn1 resultante de la mutación solo se detectó marginalmente en geles sobreexpuestos. Análisis por RT-PCR realizados previamente en el grupo confirmaron el descenso mayoritario de la expresión del alelo mutante comparada con el alelo *wild type* en ratones HTZ *Nlgn1* Thr271fs, algo esperable para un ARNm inestable. En trabajos previos del grupo, el fragmento proveniente del alelo mutante se pudo detectar fácilmente en neuronas en cultivo cuando se expresó desde vectores que codificaban para el ADNc (Tristán-Clavijo et al., 2015), sugiriendo que es la inestabilidad del ARNm transcrito del alelo mutante la causa que explica la práctica ausencia del fragmento N-terminal de Nlgn1. Podemos afirmar que la mutación asociada con AD *NLGN1* Thr271fs produce un alelo de pérdida de función, llevando los niveles de Nlgn1 al 50% cuando el alelo se encuentra en heterocigosis. De manera interesante, el análisis en muestras humanas ha mostrado una reducción similar, entre el 50-60%, de Nlgn1 en el hipocampo y la corteza de pacientes de AD y FAD (Camporesi et al., 2021; Dufort-Gervais et al., 2020). De manera adicional, el descenso de Nlgn1 es un evento temprano en modelos animales de AD y precede en años la aparición de síntomas en pacientes de AD (Bie et al., 2014a; Dufort-Gervais et al., 2020; Goetzl et al., 2018). Estos datos indican que una reducción temprana de los niveles de Nlgn1, ya sea por mecanismos genéticos o no genéticos, puede ser una característica común asociada con AD. En este escenario, el modelo animal *Nlgn1* Thr271fs ofrece una serie de ventajas para entender la implicación de Nlgn1 en el contexto global de la AD. Primero, la generación del modelo animal KI *Nlgn1* Thr271fs reproduce una mutación encontrada en pacientes. Segundo, al contrario que otras aproximaciones asociadas con AD que afectan a numerosos efectores *downstream*, la reducción por mutación genética de Nlgn1 no afecta directamente a la expresión de otros genes, aportando especificidad. Tercero, hemos caracterizado los efectos en memoria y sinápticos que produce una reducción de Nlgn1 durante toda la vida del animal, ya que el descenso de Nlgn1 actúa durante un

periodo de tiempo relativamente largo antes del diagnóstico de la enfermedad (Goetzl et al., 2018; Tristán-Clavijo et al., 2015). Por último, mediante la comparación de animales HTZ con HMZ *Nlgn1 Thr271fs* buscábamos descubrir defectos específicos causados por una pérdida parcial de *Nlgn1*, ya que la mayoría de los datos del papel de *Nlgn1* en la memoria y en la sinapsis están obtenidos a partir de una inhibición total (ratones *KO Nlgn1*) o casi total (ARN interferente) de *Nlgn1* en el cerebro de los animales (Blundell et al., 2010; Chubykin et al., 2007; M. Jiang et al., 2017; J. Kim et al., 2008; Wu et al., 2019).

Los animales *Nlgn1 Thr271fs* muestran defectos en el comportamiento típicamente asociados con enfermedades del neurodesarrollo como hiperactividad, comportamientos repetitivos y un ligero déficit en la interacción social, pero solo cuando la mutación es expresada en homocigosis. En Blundell et al., 2010 se describe un incremento similar en el tiempo de acicalamiento junto con defectos sutiles en la interacción social en animales *KO Nlgn1*. La aparición de defectos asociados con el neurodesarrollo en animales HMZ *Nlgn1 Thr271fs*, pero no en HTZ *Nlgn1 Thr271fs*, sugiere que para la aparición de dichos déficits los niveles de *Nlgn1* deben descender, al menos, por debajo del 50%. Entre los distintos genes de *NLGN*, se han encontrado mutaciones en los genes ligados al X *NLGN3* y *NLGN4X* ligados al cromosoma X en pacientes hombres, que heredaron la mutación de sus madres portadoras asintomáticas. De manera que la presencia del alelo silvestre de los genes *NLGN3* o *NLGN4X* protege de desarrollo de síntomas asociados con problemas del neurodesarrollo en las madres portadoras, en lo que parece ser una situación similar a la mutación *Nlgn1 Thr271fs*. Se desconoce si las madres portadoras de mutaciones en los genes *NLGN3* y *NLGN4X* presentan déficit de memoria durante el envejecimiento.

La pérdida de memoria es uno de los marcadores de deterioro cognitivo en la AD. Hemos encontrado que los animales con la mutación *NLGN1 Thr271fs* asociada a AD muestran déficit de memoria que dependen de los niveles de *Nlgn1*. La memoria de reconocimiento permite la distinción entre un estímulo familiar y otro novedoso y es un tipo de memoria frecuentemente afectada en pacientes de AD (Salmon et al., 2015; Viggiano et al., 2008). Sorprendentemente, hemos encontrado que la preferencia por el objeto nuevo estaba presente en los animales HTZ *Nlgn1 Thr271fs* cuando se les presentaba el estímulo novedoso con un retraso de 5 minutos, pero esta preferencia se perdía en intervalos de tiempos más largos. Sin embargo, la memoria de reconocimiento

no estaba afectada en animales HMZ Nlgn1 Thr271fs en ninguno de los diferentes intervalos de tiempo ensayados hasta ahora. Por el contrario, la memoria al miedo asociativa estaba inalterada en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs, mientras que en los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs estaba reducida. Los déficits dependientes del intervalo de tiempo en la memoria de reconocimiento de los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs corresponden con la fase de consolidación asociada con un funcionamiento normal del lóbulo temporal medial (Clark et al., 2000; Hammond et al., 2004), estableciendo una consecuencia funcional de la expresión reducida de Nlgn1 en la consolidación de la memoria. Además, la permanencia de la amnesia anterógrada dependiente del intervalo temporal en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs envejecidos, junto con la manifestación normal de una memoria asociativa al miedo, indica que la mutación Nlgn1 Thr271fs en heterocigosis afecta a las funciones cerebrales de una manera específica que no puede ser anticipada por una pérdida total de Nlgn1.

En colaboración con el grupo del Dr. Antonio Rodríguez Moreno (Universidad Pablo de Olavide) se analizaron las sinapsis CA3-CA1 del hipocampo en los animales Nlgn1 Thr271fs con el objetivo de identificar los posibles mecanismos responsables (Ver Anexos de esta Tesis Doctoral). De forma interesante encontramos que una reducción parcial de Nlgn1 genera un descenso en la transmisión sináptica glutamatérgica y en la plasticidad del hipocampo durante el envejecimiento. Las respuestas *input-output* de las neuronas de la región CA1 del hipocampo descendieron en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs de mediana edad (12 meses) y edad avanzada (18 meses), mientras que no se observaron dichos defectos en animales adultos jóvenes (4-6 meses). Por el contrario, los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs mostraron unas repuestas *input-output* normales pero un descenso en la LTP del hipocampo a una edad joven (4-6 meses). La probabilidad de liberación presináptica se encontró inalterada tanto en ratones HTZ como en ratones HMZ Nlgn1 Thr271fs, en línea con la función postsináptica de Nlgn1. La pérdida de la respuesta AMPAR dependiente de la edad en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs observada mediante los experimentos de *input-output* fue confirmada con registros de EPSCs en el área CA1 del hipocampo, donde se identificó un descenso específico en los EPSCs mediado por AMPAR y no por NMDAR. Este descenso en la transmisión sináptica mediada por AMPAR no estaba asociado con una reducción de las espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo o con cambios en los niveles totales de GluA1/2 en el hipocampo en animales

HTZ Nlgn1 Thr271fs. Estos resultados indican que el mantenimiento de unos niveles reducidos de Nlgn1 provoca un descenso en la respuesta mediada por AMPAR y en la LTP en el hipocampo durante el envejecimiento. Estos hallazgos representan un descubrimiento novedoso en el contexto de los conocimientos actuales de la función de Nlgn1 en los receptores de glutamato. A pesar de que la expresión de Nlgn1 incrementa la respuesta mediada por NMDAR y AMPAR, numerosos estudios han encontrado repetidamente un mayor descenso en la respuesta EPSCs mediada por NMDAR, y no en la mediada por AMPAR, ante una inhibición de Nlgn1 en ratones jóvenes (Blundell et al., 2010; Budreck et al., 2013; Chubykin et al., 2007; M. Jiang et al., 2017; Wu et al., 2019). Estos resultados pueden indicar que Nlgn1 no es necesaria para la respuesta mediada por AMPAR *in vivo*. Nuestros datos apuntan a un punto de vista alternativo, donde la pérdida parcial de Nlgn1 altera la transmisión sináptica mediada por AMPAR de forma dependiente de la edad. El hecho de que la transmisión sináptica basal fuera normal a lo largo de la vida de los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs podría indicar la inducción de un mecanismo de compensación. Se ha observado que la expresión de Nlgn3 puede rescatar el descenso en la respuesta sináptica mediada por AMPAR, pero no los defectos en las corrientes NMDAR o en la LTP, en neuronas hipocámpales en cultivo deficientes de Nlgn1 (Chanda et al., 2017; Shipman & Nicoll, 2012). Hemos observado en experimentos de *Western blot* que Nlgn3 incrementa específicamente en el hipocampo de animales HMZ Nlgn1 Thr271fs, sugiriendo la expresión de un mecanismo compensatorio que se induce ante la pérdida total, pero no parcial de Nlgn1. La observación de que los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs muestran defectos en la LTP dependientes de la edad sin afectar las EPSCs mediada por NMDAR es consistente con los hallazgos que muestran que Nlgn1 regula la LTP de una manera independiente de NMDAR (M. Jiang et al., 2017). Dado el papel fundamental de AMPAR en la plasticidad sináptica (Malinow & Malenka, 2002), estos datos apuntan a que el descenso en la respuesta AMPAR podría ser la causa del deterioro dependiente de la edad en la LTP del hipocampo de los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs.

En conjunto, la caracterización bioquímica y conductual de los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs desde una edad joven hasta una edad envejecida ha identificado defectos de memoria y déficits sinápticos en la transmisión mediada por AMPAR y en la LTP generados por una pérdida parcial de Nlgn1 (Figura 57). Estos defectos son distintos a los déficits sinápticos y de comportamiento producidos por una pérdida total de Nlgn1, sugiriendo

la expresión de un mecanismo compensatorio que puede ser una limitación para la identificación de defectos cuando se emplea un modelo animal no relacionado con enfermedad. El periodo relativamente largo que va desde el descenso en Nlgn1 hasta la aparición completa de los efectos sinápticos en el ratón HTZ Nlgn1 Thr271fs ofrece una ventana experimental para descubrir dianas moleculares con la finalidad de atenuar la disfunción sináptica y de memoria en AD.

Por último, estos experimentos ponen de manifiesto la necesidad en biomedicina de la generación de modelos animales que reproduzcan con fidelidad la perturbación identificada en pacientes. En una mayoría de casos, las mutaciones en genes autosómicos se encuentran en heterocigosis, afectando a un único alelo del gen. Sin embargo, una aproximación empleada con cierta asiduidad es la generación de modelos animales modificados genéticamente en los dos alelos del gen de estudio, esperando alcanzar el mismo fenotipo, pero en mayor magnitud o en un plazo de tiempo más corto. Si bien, la existencia de mecanismos compensatorios o alteraciones dependientes de dosis, como las descritas en esta Tesis, pueden alterar el fenotipo, especialmente en un órgano con una diversidad amplia de mecanismos homeostáticos como es el cerebro.

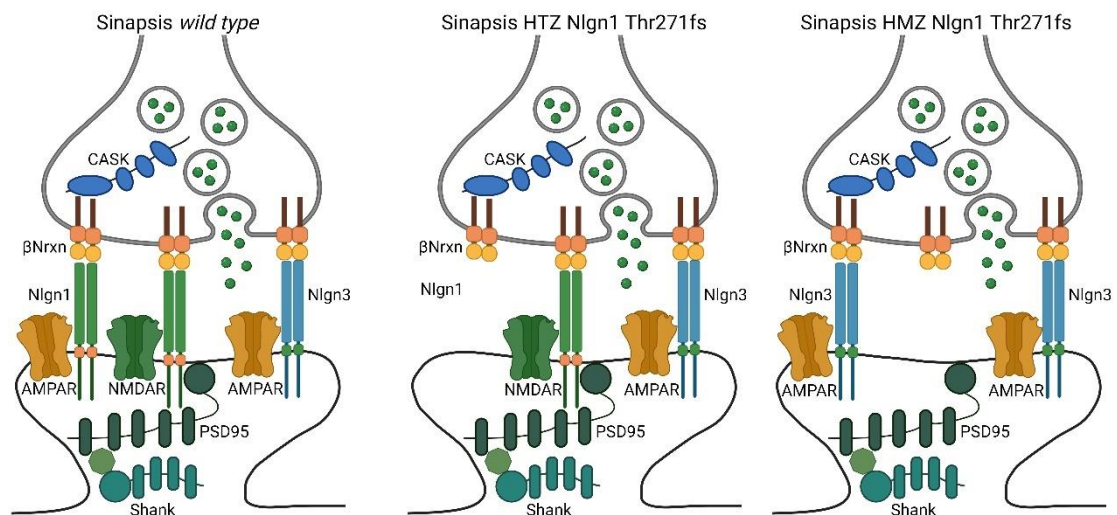


Figura 57. Representación de las alteraciones en la sinapsis Nrxn-Nlgn1 en el modelo animal Nlgn1 Thr271fs. En la sinapsis *wild type* Nlgn1 recluta receptores AMPA y NMDA. En la reducción al 50% de Nlgn1 puede ocurrir una disminución en los receptores AMPA no rescatada por Nlgn3, la expresión parcial de Nlgn1 es suficiente para mantener los niveles sinápticos de NMDAR. En la sinapsis con ausencia total de Nlgn1 se produce una reducción en los receptores NMDA mientras que los receptores AMPA son rescatados por el incremento en los niveles de Nlgn3. Esquema realizado con Biorrender.com

5 Estudio de la interacción de Neuroligina1 con APP *in vivo*

Datos recientes *in vitro* apuntan a la existencia de una relación de Nlgn1 con APP en AD. Nlgn1 podría actuar como un nucleador sináptico de A β que indujera su agregación, como se ha propuesto mediante experimentos de *surface plasmon-resonance* (Brito-Moreira et al., 2017; Dinamarca et al., 2011, 2015). Por otra parte, la inhibición de Nlgn1 podría mediar los efectos sinápticos y de memoria en AD mediante interacción directa con el péptido A β o por un mecanismo epigenético inducido por el mismo (Bie et al., 2014). Para poder abordar el papel que juega la interacción de APP con Nlgn1 *in vivo*, durante esta Tesis Doctoral se ha generado un nuevo modelo animal que expresa la mutación hAPP_{SL} asociada con AD en fondos genéticos con niveles reducidos de Nlgn1. Como modelo animal de pérdida de expresión de Nlgn1 empleamos los ratones Nlgn1 Thr271fs que expresan un alelo inactivante de Nlgn1. Los animales APP_{751SL}; Nlgn1 de los diferentes genotipos nacieron con la proporción mendeliana esperada y no presentaron diferencias en el peso. Sin embargo, pudimos detectar un gran efecto en la supervivencia temprana de los mismos. La supervivencia antes de los 120 días se redujo al 65% en los ratones APP_{751SL}; Nlgn1^{partial} y al 40% en los ratones APP_{751SL}; Nlgn1^{null}, mientras que en los ratones APP_{751SL} la supervivencia fue superior al 60%. Encontramos datos previos en la bibliografía donde se reporta un incremento en la mortalidad en las primeras semanas de vida en ratones transgénicos portadores de la mutación *Swedish* en APP y una mutación patogénica en el gen de PSEN1 humano (Y. Huang & Lemke, 2022; Minkeviciene et al., 2009; Tzeng et al., 2018). Es interesante resaltar que este efecto en la mortalidad ocurre antes de los 4 meses de vida, edad a partir de la cual se ha descrito que comienza a detectarse el acúmulo de A β en los animales APP_{751SL} (V. Blanchard et al., 2003). Nuestros datos también revelaron una ausencia de expresión detectable de A β en los ratones APP_{751SL}; Nlgn1^{partial} y en los ratones APP_{751SL}; Nlgn1^{null} antes de los 4 meses (datos no mostrados). Por tanto, el incremento en la mortalidad temprana provocado por una ausencia de Nlgn1 podría ser independiente de la expresión de A β y depender de otro tipo de interacciones entre APP y Nlgn1. Existen numerosos datos que apoyan un papel de APP como una proteína de adhesión sináptica, similar a Nlgn1. Se ha mostrado una co-localización parcial de APP con NR1 y PSD-95 en cultivos de neuronas de hipocampo, además de observarse un incremento en la densidad de espinas dendríticas cuando se

sobreexpresa APP en cultivo (Hoey et al., 2009; K. J. Lee et al., 2010). En experimentos de co-cultivo, se ha demostrado que la expresión de APP en células no neuronales promueve la formación de sinapsis en los axones que contactan (Wang et al., 2012). Más recientemente, se ha demostrado que Nrns son sustratos presinápticos de APP durante la formación de sinapsis (Cvetkovska et al., 2022). Por otro lado, se ha descrito la interacción de APP con Nrnx1 y 2 en el cerebro de ratones (Norstrom et al., 2010). Por tanto, la ausencia de Nlgn1 junto con la expresión de un mutante de APP podría estar interfiriendo en el correcto funcionamiento de las sinapsis glutamatérgicas de manera independiente a la formación de A β .

A continuación, analizamos los niveles de A β en el cerebro de animales APP_{751SL}; Nlgn1. Seleccionamos una edad avanzada, 13 meses, en la que los efectos causados por A β en el ratón APP_{751SL} son muy evidentes (J. Blanchard et al., 2008, 2011; V. Blanchard et al., 2003). Los resultados de los *Western blots* realizados revelaron que los animales con la mitad de dosis de Nlgn1 mantenían unos niveles de A β comparables a los ratones simples transgénicos APP_{751SL}, mientras que los animales carentes de expresión de Nlgn1 mostraron un notable descenso en los niveles de A β . No encontramos cambios en los niveles totales de APP en ninguno de los genotipos (datos no mostrados). La reducción en los niveles de A β podría explicarse de varias maneras. Por un lado, Nlgn1 podría estar actuando como anclaje y estabilizador de los oligómeros de A β , por lo que la ausencia de Nlgn1 reduciría la nucleación de A β facilitando su eliminación. Por otro lado, la falta de Nlgn1 podría estar actuando sobre el propio procesamiento de APP, reduciendo de alguna manera el procesamiento amiloidogénico, con la consecuente reducción en los niveles de A β .

Tras la sorprendente reducción de los niveles de A β detectada en lisados de los animales APP_{751SL}; Nlgn1^{null}, decidimos profundizar en el análisis de los defectos asociados al acúmulo de A β en el cerebro. Entre las patologías asociadas con el acúmulo de A β encontramos el depósito de formas de A β en forma de placas cerebrales (J. Blanchard et al., 2009), la hiperfosforilación de la proteína Tau asociada a estos depósitos (Boutajangout et al., 2004), una activación de la microglía (Jimenez et al., 2008) y una agregación de astrocitos alrededor de las placas (Brasnjevic et al., 2013). Realizamos un análisis por inmunohistoquímica en rodajas de cerebro en animales de 13 meses de edad donde comparamos la patología A β en animales APP_{751SL} con animales APP_{751SL}; Nlgn1^{null}.

Los animales APP_{751SL} mostraron una patología avanzada con una abundante formación de depósitos fibrilares de A β distribuidos por toda la corteza. Además, encontramos numerosos agregados de astrocitos, un aumento en la densidad de pTau y una alta presencia de microglía. Sorprendentemente, en los animales con ausencia total de Nlgn1 observamos una drástica reducción en la densidad de depósitos fibrilares acompañada de una disminución importante de los agregados de astrocitos alrededor de los mismos y de una reducción, prácticamente a niveles de los animales *wild-type*, de los niveles de Tau fosforilada. La densidad microglial no pareció verse afectada respecto a animales APP_{751SL}. Hay que destacar que el número experimental de animales APP_{751SL}; Nlgn1 disponible para el análisis histológico y bioquímico se vio reducido debido a la elevada mortalidad sufrida por este genotipo. A pesar de ello, cabe destacar que la reducción causada por la ausencia de Nlgn1 en el efecto patológico asociado con A β fue muy evidente, incluso a pesar de la alta expresión esperada para A β en la edad avanzada de los animales de estudio. Actualmente, en el grupo se están creciendo nuevas colonias de animales en el grupo para la confirmación de estos resultados y la continuación del estudio.

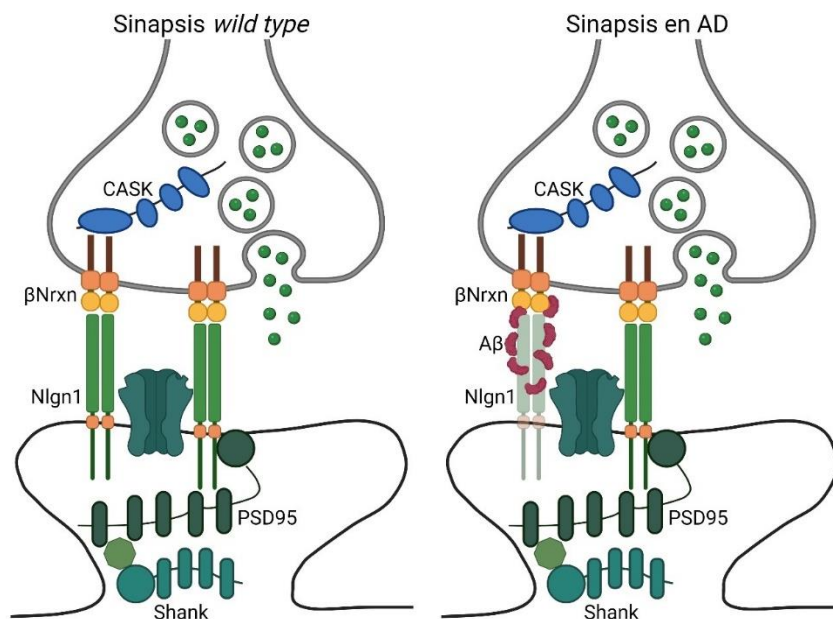


Figura 58. Esquema representativo de una sinapsis glutamatérgica *wild type* y en AD. En la sinapsis en AD observamos a el péptido A β en el espacio sináptico interactuando con Nlgn1 llevando a una reducción en los niveles de la misma

En conjunto, estos datos sugieren un papel potencial de Nlgn1 *upstream* del péptido A β , durante su generación o mantenimiento, que explicara la reducción en los niveles del péptido A β y la mejora generalizada de la patología ante la ausencia de Nlgn1. Por otra

parte, los datos presentados en esta Tesis Doctoral con el ratón Nlgn1 Thr271fs que reproduce una mutación inactivante en *NLGN1* asociada con AD, han mostrado que una reducción parcial de Nlgn1 puede desarrollar síntomas sinápticos y de memoria asociados con la enfermedad. Una posibilidad para conciliar estos distintos escenarios es que Nlgn1 actuara a dos niveles en AD: *upstream*, facilitando la generación, nucleación o mantenimiento del péptido A β y *downstream*, mediando los defectos sinápticos y de memoria causados por la propia reducción de Nlgn1 en AD (Figura 58). El esclarecimiento del papel desempeñado por Nlgn1 en el metabolismo o la función de APP *in vivo* puede tener importantes consecuencias clínicas, como la identificación de aproximaciones terapéuticas enfocadas a preservar la función normal de Nlgn1 y/o a bloquear la interacción con metabolitos de APP, que pudieran paliar la progresión o aparición de los síntomas de AD.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. El desarrollo de un modelo experimental que combina la expresión neuronal de Neurexinas con la expresión de Neuroliguinas en la membrana opuesta permite analizar el reclutamiento de isoformas concretas de Neurexinas a los contactos sinápticos.
2. Neuroliguina 1 recluta preferentemente a β Neurexina 1 a los terminales presinápticos glutamatérgicos, mientras que Neuroliguina 2 recluta a α - y β Neurexina 1 a los terminales GABAérgicos. La inserción del sitio de *splicing* 4 en Neurexina 1 tiene un efecto modulador negativo en ambas isoformas.
3. El desarrollo de los ratones condicionales PScKO^{temp} permite la delección temporal de *Psen1* en las neuronas del prosencéfalo durante el envejecimiento.
4. Los ratones PScKO^{young} presentan una neurodegeneración cortical progresiva hasta los 13 meses de edad, acompañada de astrogliosis y microgliosis.
5. La pérdida de función de Presenilinas en edad adulta genera una reducción en el grosor de la corteza y un aumento en la astrogliosis de magnitud ligeramente superior a la producida por la pérdida de función de Presenilinas de la misma duración en edad juvenil.
6. Los ratones PScKO;NrnxCTF expresan el transgén NrnxCTF en hipocampo y corteza en ausencia de Presenilinas, sin afectar la acumulación general de sustratos de Presenilinas. El patrón de expresión del transgén en el hipocampo concuerda con una localización preferentemente presináptica.
7. El incremento selectivo de la acumulación de NrnxCTF en los ratones PScKO;NrnxCTF permite analizar los efectos de dosis provocados por la falta de

- procesamiento de Neurexinas en un contexto de pérdida de función de Presenilinas.
8. La mutación Nlgn1 Thr271fs asociada a la enfermedad de Alzheimer genera un alelo nulo con la consecuente reducción en los niveles de Neuroliguina 1 al 50% en heterocigosis y la ausencia total de expresión en homocigosis.
 9. Los ratones heterocigotos Nlgn1 Thr271fs no presentan defectos relacionados con enfermedades del neurodesarrollo, mientras que los ratones homocigotos Nlgn1 Thr271fs muestran hiperactividad, un incremento en comportamientos repetitivos y un déficit sutil en la interacción social.
 10. Los ratones heterocigotos Nlgn1 Thr271fs presentan una menor duración de la memoria de reconocimiento. Este defecto no ocurre en los ratones homocigotos Nlgn1 Thr271fs. Por el contrario, los ratones homocigotos Nlgn1 Thr271fs presentan una menor expresión de la memoria asociativa de miedo, que no aparece en los ratones heterocigotos Nlgn1 Thr271fs.
 11. Los ratones heterocigotos Nlgn1 Thr271fs presentan una densidad normal de espinas dendríticas en las neuronas CA1 del hipocampo, acompañada de niveles normales de los componentes de sinapsis excitatorias estudiados. Los ratones homocigotos Nlgn1 Thr271fs presentan un incremento específico en los niveles de Neuroliguina 3, sugiriendo la existencia de un mecanismo compensatorio asociado a una pérdida total de Neuroliguina 1.
 12. La expresión del transgén hAPP_{751SL} en un contexto de niveles decrecientes de Neuroliguina 1 no tiene impacto sobre el peso de los animales. Sin embargo, se incrementa la mortalidad temprana de forma inversa a los niveles de Neuroliguina 1.
 13. La ausencia de Neuroliguina 1 reduce drásticamente los niveles de A β y la patología asociada en el limitado número de ratones estudiados.

VII. ANEXOS

1 Análisis electrofisiológico de los animales Nlgn1 Thr271fs

Los experimentos que se detallan a continuación se realizaron en el grupo de investigación del Dr Antonio Rodríguez Moreno (Universidad Pablo de Olavide).

La caracterización fenotípica de los animales Nlgn1 Thr271fs ha mostrado defectos diferentes en los animales HTZ y HMZ Nlgn1 Thr271fs, sugiriendo que pudieran estar afectados distintos mecanismos sinápticos. La implicación del hipocampo en la memoria espacial y no espacial, así como las sinapsis CA3-CA1 están ampliamente estudiadas en la literatura. Se ha descrito previamente como una ausencia total de Nlgn1 en los animales KO Nlgn1 tienen un descenso en la LTP en las sinapsis CA3-CA1 (Blundell et al., 2010). Se realizaron registros electrofisiológicos de campo en rodajas de hipocampo de animales HTZ y HMZ Nlgn1 Thr271fs de 4-6 meses de edad. Las curvas de *input-output* fueron similares a los animales Nlgn1 Thr271fs tanto en animales HTZ como HMZ Nlgn1 Thr271fs. Tampoco se encontró afectada la facilitación *paired-pulse* (PFF) (Figura 59).

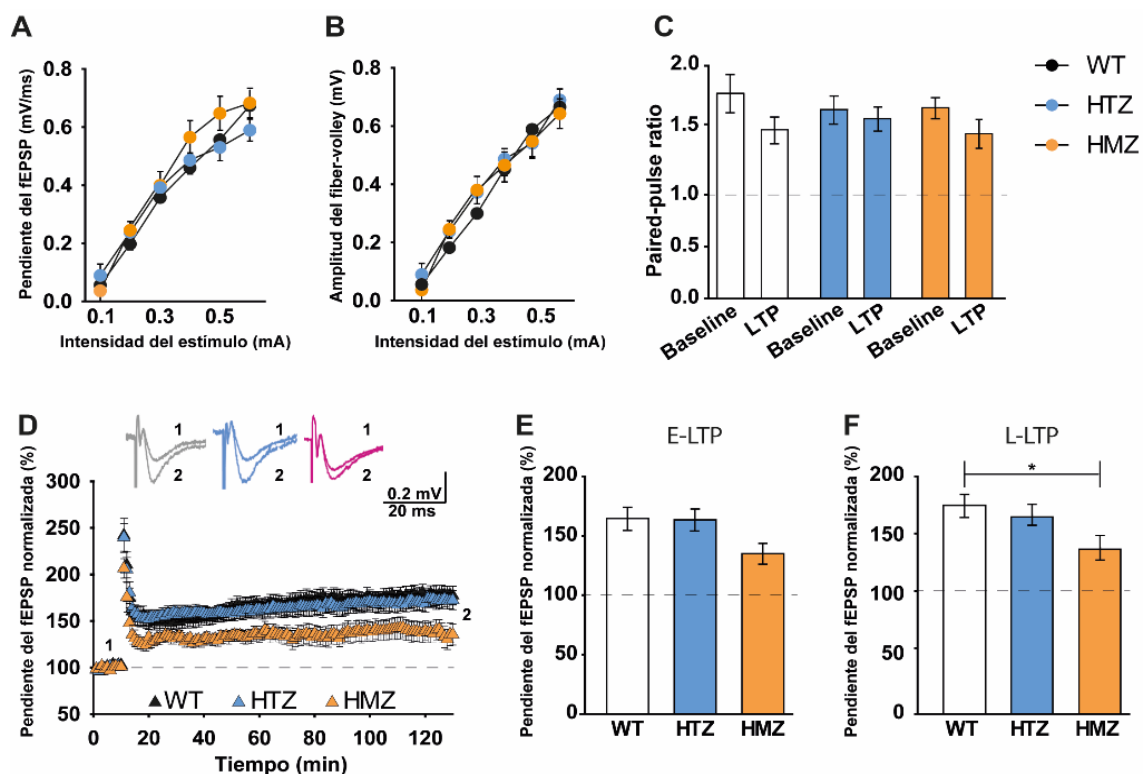


Figura 59. Registros electrofisiológicos en el área CA1 del hipocampo de animales Nlgn1 Thr271fs jóvenes. A y B.- Curvas *input-output*. N= 6 *wild type*, 6 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 6 HMZ Nlgn1 Thr271fs. C.- *Paired-pulse ratio* en rodajas hipocampales. N= 12 *wild type*, 19 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 7 HMZ Nlgn1 Thr271fs. D.- Pendiente del fEPSP a lo largo del tiempo antes y después de la inducción de LTP en la región CA1 del hipocampo. E y F.- Cuantificación de la LTP temprana (e-LTP) o tardía (L-LTP). N= 15 *wild type*, 22 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 8 HMZ Nlgn1 Thr271fs. ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey. * $p < 0.05$. Las barras de error representan la SEM.

Estos datos indican que la transmisión sináptica y la plasticidad presináptica basal no se ven afectados por la pérdida parcial o total de Nlgn1. Se realizó un estudio de potenciación a largo plazo (LTP) en las neuronas de la región CA1 del hipocampo. Los estímulos de alta frecuencia indujeron un incremento en la eficacia sináptica en las sinapsis de la CA1 en animales *wild type* que duró al menos 120 minutos. Mientras que la magnitud de la LTP en los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs fue similar a la de los animales *wild type*, los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs mostraron un descenso en la LTP similar a lo que ocurre en los animales KO Nlgn1 (Blundell et al., 2010) (Figura 59). Estos datos indican que una pérdida total de Nlgn1 y no la pérdida parcial producen defectos en la LTP del hipocampo en animales jóvenes.

Dado que el envejecimiento es el factor no genético más importante asociado con la enfermedad de Alzheimer, decidimos analizar la función sináptica en animales Nlgn1 Thr271fs durante el envejecimiento. En un primer conjunto de experimentos se analizaron las sinapsis CA3-CA1 en animales de 12 meses. Tanto las curvas de *input-output* como la PPF no se veían afectadas en animales HMZ Nlgn1 Thr271fs (Figura 60).

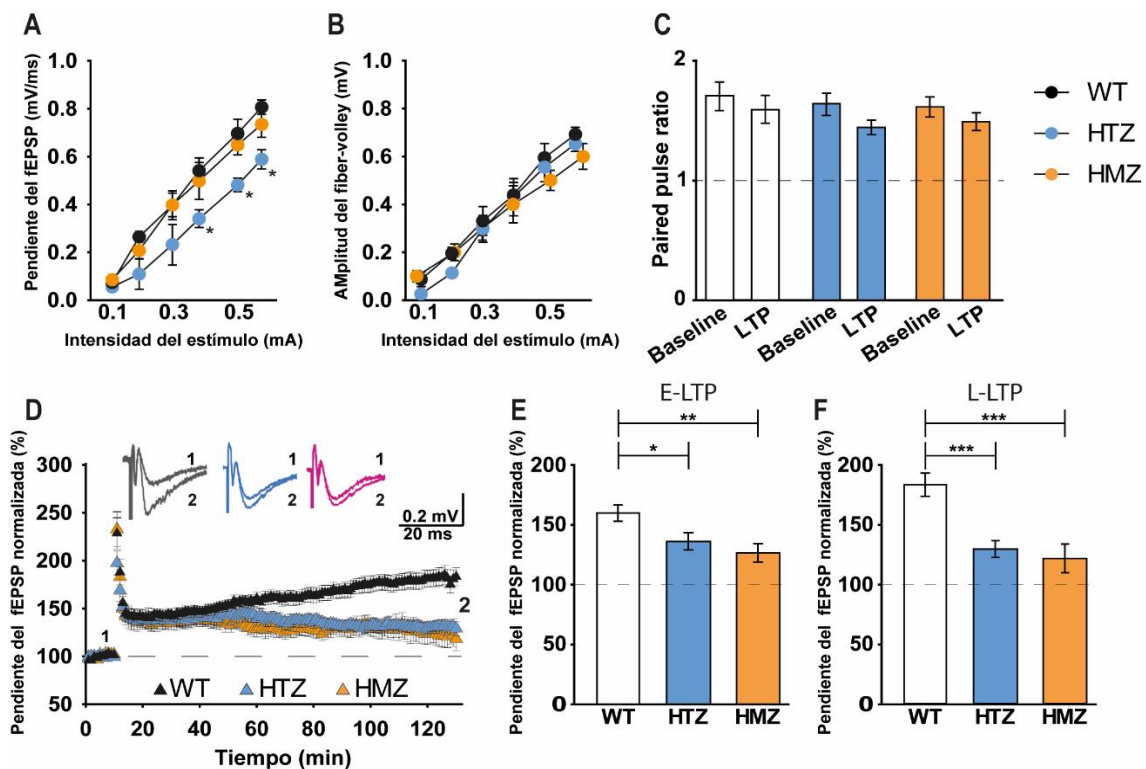


Figura 60. Registros electrofisiológicos en el área CA1 del hipocampo de animales Nlgn1 Thr271fs de 12 meses. A y B.- Curvas *input-output*. N= 6 *wild type*, 6 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 6 HMZ Nlgn1 Thr271fs. C.- *Paired-pulse ratio* en rodajas hipocampales. N= 18 *wild type*, 15 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 8 HMZ Nlgn1 Thr271fs. D.- Pendiente del fEPSP a lo largo del tiempo antes y después de la inducción de LTP en la región CA1 del hipocampo. E y F.- Cuantificación de la LTP temprana (e-LTP) o tardía (L-LTP). N= 22 *wild type*, 18 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 12 HMZ Nlgn1 Thr271fs. ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Las barras de error representan la SEM.

Se observó un descenso en la respuesta LTP en los HMZ Nlgn1 Thr271fs de 12 meses de edad similar al encontrado en los animales de mismo genotipo más jóvenes. Por otro lado, en los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs encontramos una situación diferente. En contraste con lo observado en los animales más jóvenes, se observó un descenso en las curvas *input-output* en comparación con animales *wild type* (Figura 60). La PPF no estaba alterada en los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs envejecidos. Sorprendentemente, los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs envejecidos mostraron un descenso en la LTP en llevándola a niveles similares a lo observados en los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs (Figura 60). En conjunto, estos datos sugieren que la pérdida parcial de Nlgn1 produce unos defectos dependientes de la edad en la plasticidad en el hipocampo, mientras que los defectos asociados a la pérdida total de Nlgn1 no se ven incrementados con la edad.

Para continuar analizando los efectos del envejecimiento se realizaron registros de campo en las sinapsis CA3-CA1 en animales de 18 meses de edad. De nuevo, se reportó un descenso en las curvas *input-output* en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs de 18 meses que no estaba presente en los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs de la misma edad (Figura 61).

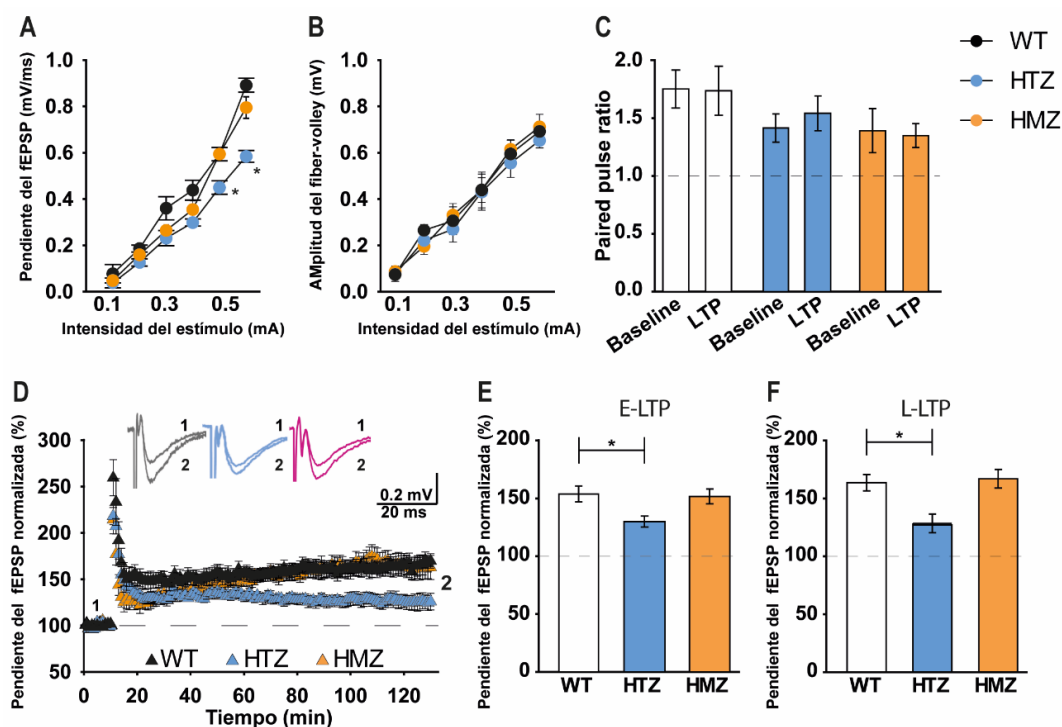


Figura 61. Registros electrofisiológicos en el área CA1 del hipocampo de animales Nlgn1 Thr271fs de 18 meses. **A y B.** Curvas *input-output*. N= 6 *wild type*, 6 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 6 HMZ Nlgn1 Thr271fs. **C.** *Paired-pulse ratio* en rodajas hipocampales. N= 6 *wild type*, 7 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 6 HMZ Nlgn1 Thr271fs. **D.** Pendiente del fEPSP a lo largo del tiempo antes y después de la inducción de LTP en la región CA1 del hipocampo. **E y F.** Cuantificación de la LTP temprana (e-LTP) o tardía (L-LTP). N= 7 *wild type*, 8 HTZ Nlgn1 Thr271fs, 8 HMZ Nlgn1 Thr271fs. ANOVA de una vía con *post-hoc* Tukey. * $p < 0.05$. Las barras de error representan la SEM.

La PPF no estaba alterada en los animales Nlgn1 Thr271fs. La LTP CA3-CA1 mostró un

descenso en los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs similar al encontrado en los animales de 12 meses (Figura 61). Por el contrario, la LTP en los animales HMZ Nlgn1 Thr271fs mostró una magnitud similar a animales *wild type* (Figura 61). Estos datos parecen indicar que la pérdida parcial de Nlgn1 producen unos déficits dependientes de la edad permanentes en la plasticidad sináptica en el hipocampo que no se encuentran en animales jóvenes.

El descenso de la respuesta NMDAR es una característica previamente asociada con una pérdida de Nlgn1 en animales jóvenes (Blundell et al., 2010; Chubykin et al., 2007; Kim et al., 2008), sin embargo, los efectos que pudiera tener una pérdida parcial de Nlgn1 sobre las respuestas NMDAR y AMPAR son desconocidos. Se realizaron registros de *patch-clamp* en neuronas de la región CA1 del hipocampo de animales HTZ Nlgn1 Thr271fs jóvenes y envejecidos. Los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs jóvenes (1-2 meses) mostraron corrientes NMDAR y AMPAR similares a las observadas en animales *wild type*, no reflejando ningún cambio en las ratios NMDA/AMPA ni en las curvas *input-output* (Figura 62). Posteriormente se llevaron a cabo experimentos de *patch-clamp* en neuronas hipocámpales de animales de 18 meses, edad en la que la respuesta *input-output* en registros de campo excitatorios postsinápticos estaba disminuida en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs. Se observó un descenso específico de las corrientes AMPAR en las neuronas hipocámpales de la región CA1, mientras que las corrientes NMDAR no se vieron afectadas, reflejándose en un incremento en la ratio NMDAR/AMPA (Figura 62). Las curvas *input-output* obtenidas en paralelo en los experimentos de *patch-clamp* confirmaron el descenso en la fortaleza sináptica en las neuronas hipocámpales de la región CA1 encontrada en los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs.

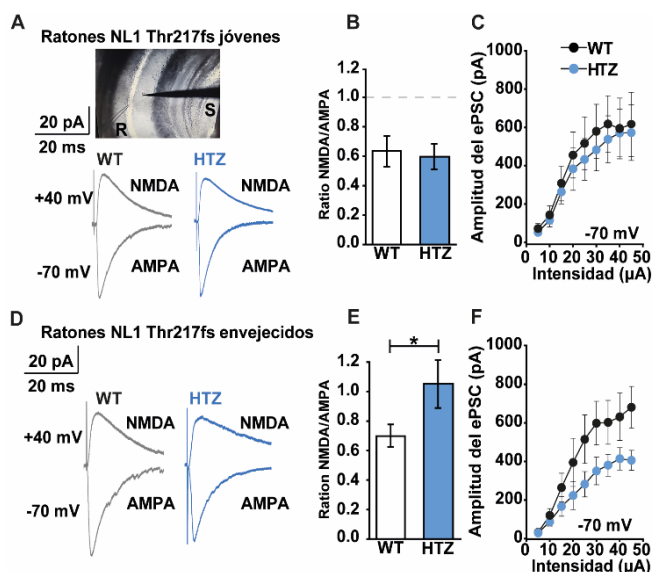


Figura 62. Pérdida de la respuesta AMPA con la edad en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs. A.- Registros de *patch-clamp* en neuronas hipocámpales de animales HTZ Nlgn1 Thr271fs de 1-2 meses. B.- Ratio NMDAR/AMPA normal en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs. C.- curvas *input-output* en neuronas de la región CA1 del hipocampo obtenidas con registros de célula completa. N= 12 *wild type*, 11 HTZ Nlgn1 Thr271fs. D.- Registros representativos de la corriente AMPAR y NMDAR en neuronas de la región CA1 del hipocampo de animales de 16 meses. Se observa un descenso en la corriente AMPA en los animales HTZ Nlgn1 Thr271fs. E.- Incremento en el ratio NMDAR/AMPA en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs de 16 meses. Análisis estadístico: *t-test*. * $p < 0.05$. F.- Descenso en las curvas *input-output* en animales HTZ Nlgn1 Thr271fs de 16 meses. N= 12 *wild type*, 11 HTZ Nlgn1 Thr271fs.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ainge, J. A., Heron-Maxwell, C., Theofilas, P., Wright, P., de Hoz, L., & Wood, E. R. (2006). The role of the hippocampus in object recognition in rats: Examination of the influence of task parameters and lesion size. *Behavioural Brain Research*, *167*(1), 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.09.005>
- Albasser, M. M., Amin, E., Lin, T.-C. E., Iordanova, M. D., & Aggleton, J. P. (2012). Evidence that the rat hippocampus has contrasting roles in object recognition memory and object recency memory. *Behavioral Neuroscience*, *126*(5), 659–669. <https://doi.org/10.1037/a0029754>
- Ali, H., Marth, L., & Krueger-Burg, D. (2020). Neuroligin-2 as a central organizer of inhibitory synapses in health and disease. *Science Signaling*, *13*(663). <https://doi.org/10.1126/scisignal.abd8379>
- American Psychiatric Association [APA]. (2022). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Fifth).
- Andrade-Talavera, Y., Benito, I., Casañas, J. J., Rodríguez-Moreno, A., & Montesinos, M. L. (2015). Rapamycin restores BDNF-LTP and the persistence of long-term memory in a model of Down's syndrome. *Neurobiology of Disease*, *82*, 516–525. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.09.005>
- Aoki, C., Lee, J., Nedeleescu, H., Ahmed, T., Ho, A., & Shen, J. (2009). Increased levels of NMDA receptor NR2A subunits at pre- and postsynaptic sites of the hippocampal CA1: An early response to conditional double knockout of presenilin 1 and 2. *Journal of Comparative Neurology*, *517*(4), 512–523. <https://doi.org/10.1002/cne.22151>
- Araki, Y., Miyagi, N., Kato, N., Yoshida, T., Wada, S., Nishimura, M., Komano, H., Yamamoto, T., de Strooper, B., Yamamoto, K., & Suzuki, T. (2004). Coordinated Metabolism of Alcadein and Amyloid β -Protein Precursor Regulates FE65-dependent Gene Transactivation. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(23), 24343–24354. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401925200>
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., & Lake, R. J. (1999). Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science*, *284*(5415), 770–776. <https://doi.org/10.1126/science.284.5415.770>
- Babaev, O., Botta, P., Meyer, E., Müller, C., Ehrenreich, H., Brose, N., Lüthi, A., & Krueger-Burg, D. (2016). Neuroligin 2 deletion alters inhibitory synapse function and anxiety-

- associated neuronal activation in the amygdala. *Neuropharmacology*, *100*, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.06.016>
- Beglopoulos, V., Sun, X., Saura, C. A., Lemere, C. A., Kim, R. D., & Shen, J. (2004). Reduced β -amyloid production and increased inflammatory responses in presenilin conditional knock-out mice. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(45), 46907–46914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409544200>
- Bie, B., Wu, J., Yang, H., Xu, J. J., Brown, D. L., & Naguib, M. (2014a). Epigenetic suppression of neuroligin 1 underlies amyloid-induced memory deficiency. *Nature Neuroscience*, *17*(2), 223–231. <https://doi.org/10.1038/nn.3618>
- Bie, B., Wu, J., Yang, H., Xu, J. J., Brown, D. L., & Naguib, M. (2014b). Epigenetic suppression of neuroligin 1 underlies amyloid-induced memory deficiency. *Nature Neuroscience*, *17*(2), 223–231. <https://doi.org/10.1038/nn.3618>
- Biederer, T., & Südhof, T. C. (2001). CASK and Protein 4.1 Support F-actin Nucleation on Neurexins. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(51), 47869–47876. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105287200>
- Blanchard, J., Decorte, L., Noguès, X., & Micheau, J. (2009). Characterization of cognition alteration across the course of the disease in APP751SL mice with parallel estimation of cerebral A β deposition. *Behavioural Brain Research*, *201*(1), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.02.005>
- Blanchard, J., Martel, G., Brayda-Bruno, L., Noguès, X., & Micheau, J. (2011). Detection of age-dependent working memory deterioration in APP751SL mice. *Behavioural Brain Research*, *218*(1), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.040>
- Blanchard, J., Martel, G., Guillou, J. L., Noguès, X., & Micheau, J. (2008). Impairment of spatial memory consolidation in APP751SL mice results in cue-guided response. *Neurobiology of Aging*, *29*(7), 1011–1021. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.010>
- Blanchard, V., Moussaoui, S., Czech, C., Touchet, N., Bonici, B., Planche, M., Canton, T., Jedidi, I., Gohin, M., Wirths, O., Bayer, T. A., Langui, D., Duyckaerts, C., Tremp, G., & Pradier, L. (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A β deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Experimental Neurology*, *184*(1), 247–263. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00252-8)

- Blundell, J., Blaiss, C. A., Etherton, M. R., Espinosa, F., Tabuchi, K., Walz, C., Bolliger, M. F., Südhof, T. C., & Powell, C. M. (2010). Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *Journal of Neuroscience*, *30*(6), 2115–2129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4517-09.2010>
- Borcel, E., Palczynska, M., Krzisch, M., Dimitrov, M., Ulrich, G., Toni, N., & Fraering, P. C. (2016). Shedding of neurexin 3 β ectodomain by ADAM10 releases a soluble fragment that affects the development of newborn neurons. *Scientific Reports*, *6*(1), 39310. <https://doi.org/10.1038/srep39310>
- Bot, N., Schweizer, C., Ben Halima, S., & Fraering, P. C. (2011). Processing of the Synaptic Cell Adhesion Molecule Neurexin-3 β by Alzheimer Disease α - and γ -Secretases. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(4), 2762–2773. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.142521>
- Boucard, A. A., Chubykin, A. A., Comoletti, D., Taylor, P., & Südhof, T. C. (2005). A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to α - and β -neurexins. *Neuron*, *48*(2), 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.026>
- Boucard, A. A., Ko, J., & Südhof, T. C. (2012). High Affinity Neurexin Binding to Cell Adhesion G-protein-coupled Receptor CIRL1/Latrophilin-1 Produces an Intercellular Adhesion Complex. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(12), 9399–9413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318659>
- Boutajangout, A., Authelet, M., Blanchard, V., Touchet, N., Tremp, G., Pradier, L., & Brion, J. P. (2004). Characterisation of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic for wild-type human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiology of Disease*, *15*(1), 47–60. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.09.007>
- Brasnjevic, I., Lardenoije, R., Schmitz, C., Kolk, N., Dickstein, D., Takahashi, H., Hof, P., Steinbusch, H., & Rutten, B. (2013). Region-specific neuron and synapse loss in the hippocampus of APPSL/PS1 knock-in mice. *Translational Neuroscience*, *4*(1). <https://doi.org/10.2478/s13380-013-0111-8>
- Brito-Moreira, J., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., Ribeiro, F. C., Ledo, J. H., Diniz, L. P., Vital, J. F. S., Magdesian, M. H., Melo, H. M., Barros-Aragão, F., De Souza, J. M., Alves-Leon, S. V., Gomes, F. C. A., Clarke, J. R., Figueiredo, C. P., De Felice, F. G., & Ferreira,

- S. T. (2017). Interaction of amyloid- β (A β) oligomers with neurexin 2 α and neuroligin 1 mediates synapse damage and memory loss in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 292(18), 7327–7337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.761189>
- Broadbent, N. J., Gaskin, S., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2010). Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & Memory*, 17(1), 5–11. <https://doi.org/10.1101/lm.1650110>
- Budreck, E. C., Kwon, O.-B., Jung, J. H., Baudouin, S., Thommen, A., Kim, H.-S., Fukazawa, Y., Harada, H., Tabuchi, K., Shigemoto, R., Scheiffele, P., & Kim, J.-H. (2013). Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(2), 725–730. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214718110>
- Budreck, E. C., & Scheiffele, P. (2007). Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *European Journal of Neuroscience*, 26(7), 1738–1748. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05842.x>
- Camacho-Garcia, R. J., Hervás, A., Toma, C., Balmaña, N., Cormand, B., Martínez-Mir, A., & Scholl, F. G. (2013). Rare variants analysis of neurexin-1 β in autism reveals a novel start codon mutation affecting protein levels at synapses. *Psychiatric Genetics*, 23(6), 262–266. <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000013>
- Camacho-Garcia, R. J., Planelles, M. I., Margalef, M., Pecero, M. L., Martínez-Leal, R., Aguilera, F., Vilella, E., Martínez-Mir, A., & Scholl, F. G. (2012). Mutations affecting synaptic levels of neurexin-1 β in autism and mental retardation. *Neurobiology of Disease*, 47(1), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.03.031>
- Camporesi, E., Lashley, T., Gobom, J., Lantero-Rodriguez, J., Hansson, O., Zetterberg, H., Blennow, K., & Becker, B. (2021). Neuroligin-1 in brain and CSF of neurodegenerative disorders: investigation for synaptic biomarkers. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01119-4>
- Chanda, S., Aoto, J., Lee, S. J., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2016). Pathogenic mechanism of an autism-associated neuroligin mutation involves altered AMPA-receptor trafficking. *Molecular Psychiatry*, 21(2), 169–177. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.20>
- Chanda, S., Hale, W. D., Zhang, B., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2017). Unique versus redundant functions of neuroligin genes in shaping excitatory and inhibitory synapse

- properties. *Journal of Neuroscience*, 37(29), 6816–6836.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0125-17.2017>
- Checler, F. (1995). Processing of the β -Amyloid Precursor Protein and Its Regulation in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 65(4), 1431–1444.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65041431.x>
- Chih, B., Gollan, L., & Scheiffele, P. (2006). Alternative Splicing Controls Selective Trans-Synaptic Interactions of the Neuroligin-Neurexin Complex. *Neuron*, 51(2), 171–178.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.005>
- Ching, M. S. L., Shen, Y., Tan, W.-H., Jeste, S. S., Morrow, E. M., Chen, X., Mukaddes, N. M., Yoo, S.-Y., Hanson, E., Hundley, R., Austin, C., Becker, R. E., Berry, G. T., Driscoll, K., Engle, E. C., Friedman, S., Gusella, J. F., Hisama, F. M., Irons, M. B., ... Wu, B.-L. (2010). Deletions of NRXN1 (neurexin-1) predispose to a wide spectrum of developmental disorders. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31063>
- Cho, Y., Bae, H. G., Okun, E., Arumugam, T. v., & Jo, D. G. (2022). Physiology and pharmacology of amyloid precursor protein. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 235). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108122>
- Choleris, E., A W Thomas, M Kavaliers, & F S Prato. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 235–260. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00011-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00011-2)
- Chubykin, A. A., Atasoy, D., Etherton, M. R., Brose, N., Kavalali, E. T., Gibson, J. R., & Südhof, T. C. (2007). Activity-Dependent Validation of Excitatory versus Inhibitory Synapses by Neuroligin-1 versus Neuroligin-2. *Neuron*, 54(6), 919–931.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.029>
- Cinalli, D. A., Cohen, S. J., Guthrie, K., & Stackman, R. W. (2020). Object Recognition Memory: Distinct Yet Complementary Roles of the Mouse CA1 and Perirhinal Cortex. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.527543>
- Clark, R. E., Zola, S. M., & Squire, L. R. (2000). Impaired Recognition Memory in Rats after Damage to the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 20(23), 8853–8860.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-08853.2000>

- Comoletti, D., Flynn, R., Jennings, L. L., Chubykin, A., Matsumura, T., Hasegawa, H., Südhof, T. C., & Taylor, P. (2003). Characterization of the Interaction of a Recombinant Soluble Neuroligin-1 with Neurexin-1 β . *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50497–50505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306803200>
- Connor, S. A., Ammendrup-Johnsen, I., Chan, A. W., Kishimoto, Y., Murayama, C., Kurihara, N., Tada, A., Ge, Y., Lu, H., Yan, R., LeDue, J. M., Matsumoto, H., Kiyonari, H., Kirino, Y., Matsuzaki, F., Suzuki, T., Murphy, T. H., Wang, Y. T., Yamamoto, T., & Craig, A. M. (2016). Altered Cortical Dynamics and Cognitive Function upon Haploinsufficiency of the Autism-Linked Excitatory Synaptic Suppressor MDGA2. *Neuron*, 91(5), 1052–1068. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.016>
- Crawley, J. N. (2012). Translational animal models of autism and neurodevelopmental disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14(3), 293–305. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2012.14.3/jcrawley>
- Cvetkovska, V., Ge, Y., Xu, Q., Li, S., Zhang, P., & Craig, A. M. (2022). Neurexin- β Mediates the Synaptogenic Activity of Amyloid Precursor Protein. *The Journal of Neuroscience*, JN-RM-0511-21. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0511-21.2022>
- Dabell, M. P., Rosenfeld, J. A., Bader, P., Escobar, L. F., El-Khechen, D., Vallee, S. E., Dinulos, M. B. P., Curry, C., Fisher, J., Tervo, R., Hannibal, M. C., Siefkas, K., Wyatt, P. R., Hughes, L., Smith, R., Ellingwood, S., Lacassie, Y., Stroud, T., Farrell, S. A., ... Shaffer, L. G. (2013). Investigation of *NRXN1* deletions: Clinical and molecular characterization. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 161(4), 717–731. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35780>
- Dai, J., Liakath-Ali, K., Golf, S. R., & Südhof, T. C. (2022). Distinct neurexin-cerebellin complexes control AMPA- and NMDA-receptor responses in a circuit-dependent manner. *eLife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.78649>
- Dang, R., Qi, J., Liu, A., Ren, Q., Lv, D., Han, L., Zhou, Z., Cao, F., Xie, W., & Jia, Z. (2018). Regulation of hippocampal long term depression by Neuroligin 1. *Neuropharmacology*, 143, 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.09.035>
- de Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., & Kopan, R. (1999). A

- presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 398(6727), 518–522. <https://doi.org/10.1038/19083>
- de Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., von Figura, K., & van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 391(6665), 387–390. <https://doi.org/10.1038/34910>
- Dean, C., Scholl, F. G., Choih, J., Demaria, S., Berger, J., Isacoff, E., & Scheiffele, P. (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. In *NATURE NEUROSCIENCE* (Vol. 6). <http://www.nature.com/natureneuroscience>
- Dean, C., Scholl, F. G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., & Scheiffele, P. (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nature Neuroscience*, 6(7), 708–716.
- Dehury, B., Tang, N., Blundell, T. L., & Kepp, K. P. (2019). Structure and dynamics of γ -secretase with presenilin 2 compared to presenilin 1. *RSC Advances*, 9(36), 20901–20916. <https://doi.org/10.1039/c9ra02623a>
- DeKosky, S. T., & Scheff, S. W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Annals of Neurology*, 27(5), 457–464. <https://doi.org/10.1002/ana.410270502>
- Dinamarca, M. C., Di Luca, M., Godoy, J. A., & Inestrosa, N. C. (2015). The soluble extracellular fragment of neuroligin-1 targets A β oligomers to the postsynaptic region of excitatory synapses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 466(1), 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.107>
- Dinamarca, M. C., Weinstein, D., Monasterio, O., & Inestrosa, N. C. (2011). The synaptic protein neuroligin-1 interacts with the amyloid β -peptide. is there a role in Alzheimer's disease? *Biochemistry*, 50(38), 8127–8137. <https://doi.org/10.1021/bi201246t>
- Doody, R. S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., He, F., Sun, X., Thomas, R. G., Aisen, P. S., Siemers, E., Sethuraman, G., & Mohs, R. (2013). A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 369(4), 341–350. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1210951>
- Dufort-Gervais, J., Provost, C., Charbonneau, L., Norris, C. M., Calon, F., Mongrain, V., & Brouillette, J. (2020). Neuroligin-1 is altered in the hippocampus of Alzheimer's

- disease patients and mouse models, and modulates the toxicity of amyloid-beta oligomers. *Scientific Reports*, *10*(1), 6956. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63255-6>
- Duggan, S. P., & McCarthy, J. v. (2016). Beyond γ -secretase activity: The multifunctional nature of presenilins in cell signalling pathways. In *Cellular Signalling* (Vol. 28, Issue 1, pp. 1–11). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.10.006>
- Elegheert, J., Cvetkovska, V., Clayton, A. J., Heroven, C., Vennekens, K. M., Smukowski, S. N., Regan, M. C., Jia, W., Smith, A. C., Furukawa, H., Savas, J. N., de Wit, J., Begbie, J., Craig, A. M., & Aricescu, A. R. (2017). Structural Mechanism for Modulation of Synaptic Neuroligin-Neurexin Signaling by MDGA Proteins. *Neuron*, *95*(4), 896–913.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.040>
- Erdmann, G., Schütz, G., & Berger, S. (2007). Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC Neuroscience*, *8*(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-63>
- Etherton, M., Földy, C., Sharma, M., Tabuchi, K., Liu, X., Shamloo, M., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2011). Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(33), 13764–13769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111093108>
- Fan, S., Gangwar, S. P., Machius, M., & Rudenko, G. (2021). Interplay between hevin, SPARC, and MDGAs: Modulators of neurexin-neuroligin transsynaptic bridges. *Structure*, *29*(7), 664–678.e6. <https://doi.org/10.1016/j.str.2021.01.003>
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., & Chambon, P. (1997). Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *237*(3), 752–757. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7124>
- Forwood, S. E., Winters, B. D., & Bussey, T. J. (2005). Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus*, *15*(3), 347–355. <https://doi.org/10.1002/hipo.20059>
- Gascón, S., Paez-Gomez, J. A., Díaz-Guerra, M., Scheiffele, P., & Scholl, F. G. (2008). Dual-promoter lentiviral vectors for constitutive and regulated gene expression in

- neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 168(1), 104–112.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.09.023>
- Gaskin, S., Tremblay, A., & Mumby, D. G. (2003). Retrograde and anterograde object recognition in rats with hippocampal lesions. *Hippocampus*, 13(8), 962–969.
<https://doi.org/10.1002/hipo.10154>
- Gauthier, J., Siddiqui, T. J., Huashan, P., Yokomaku, D., Hamdan, F. F., Champagne, N., Lapointe, M., Spiegelman, D., Noreau, A., Lafrenière, R. G., Fathalli, F., Joobor, R., Krebs, M.-O., DeLisi, L. E., Mottron, L., Fombonne, É., Michaud, J. L., Drapeau, P., Carbonetto, S., ... Rouleau, G. A. (2011). Truncating mutations in NRXN2 and NRXN1 in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Human Genetics*, 130(4), 563–573.
<https://doi.org/10.1007/s00439-011-0975-z>
- Goetzl, E. J., Abner, E. L., Jicha, G. A., Kapogiannis, D., & Schwartz, J. B. (2018). Declining levels of functionally specialized synaptic proteins in plasma neuronal exosomes with progression of Alzheimer's disease. *FASEB Journal*, 32(2), 888–893.
<https://doi.org/10.1096/fj.201700731R>
- Gomez, A. M., Traunmüller, L., & Scheiffele, P. (2021). Neurexins: molecular codes for shaping neuronal synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 22(3), 137–151.
<https://doi.org/10.1038/s41583-020-00415-7>
- Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S. X., Linhoff, M. W., & Craig, A. M. (2004). Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell*, 119(7), 1013–1026. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.035>
- Grootjans, J. J., Reekmans, G., Ceulemans, H., & David, G. (2000). Syntenin-Syndecan Binding Requires Syndecan-Syntenin and the Co-operation of Both PDZ Domains of Syntenin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19933–19941.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M002459200>
- Güner, G., & Lichtenthaler, S. F. (2020). The substrate repertoire of γ -secretase/presenilin. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 105, pp. 27–42). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.05.019>
- Guo, Q., Fu, W., Sopher, B. L., Miller, M. W., Ware, C. B., Martin, G. M., & Mattson, M. P. (1999). Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nature Medicine*, 5(1), 101–106.
<https://doi.org/10.1038/4789>

- Haapasalo, A., & Kovacs, D. M. (2011). The many substrates of presenilin/ γ -secretase. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 25, Issue 1, pp. 3–28). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101065>
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>
- Hammond, R., Laura E.Tull, & Robert W.Stackman. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.03.005>
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Harrison, F. E., Hosseini, A. H., & McDonald, M. P. (2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research*, 198(1), 247–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.015>
- Hartmann, D., Bart de Strooper, Lutgarde Serneels, Katleen Craessaerts, An Herreman, Wim Annaert, Lieve Umans, Torben Lübke, Anna Lena Illert, Kurt von Figura, & Paul Saftig. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Human Molecular Genetics*, 11(21), 2615–2624. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.21.2615>
- Heine, M., Thoumine, O., Mondin, M., Tessier, B., Giannone, G., & Choquet, D. (2008). Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroigin contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20947–20952. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804007106>
- Herrup, K. (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature Neuroscience*, 18(6), 794–799. <https://doi.org/10.1038/nn.4017>
- Ho, A., & Shen, J. (2011). Presenilins in synaptic function and disease. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 17, Issue 11, pp. 617–624). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.06.002>
- Hoey, S. E., Williams, R. J., & Perkinson, M. S. (2009). Synaptic NMDA Receptor Activation Stimulates γ -Secretase Amyloid Precursor Protein Processing and Inhibits

- Amyloid- Production. *Journal of Neuroscience*, 29(14), 4442–4460.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6017-08.2009>
- Huakui Yu, Carlos A. Saura, Se-Young Choi, Linus D. Sun, Xudong Yang, Melissa Handler, Takeshi Kawarabayashi, Linda Younkin, Bogdan Gedeles, Matthew A. Wilson, Steve Younkin, Eric R. Kandel, Alfredo Kikwood, & Jie Shen. (2001). APP processing and Synaptic Plasticity in Presenilin-1 Conditional Knockout Mice. *Neuron*, 31, 713–726.
- Huang, H., & He, X. (2008). Wnt/ β -catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), 119–125.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.009>
- Huang, Y., & Lemke, G. (2022). Early death in a mouse model of Alzheimer’s disease exacerbated by microglial loss of TAM receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(41). <https://doi.org/10.1073/pnas.2204306119>
- Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Uirich, B., Messier, M., Moomaw, C., & Südhof, T. C. (1995). Neuroligin 1: A Splice Site-Specific Ligand for I-Neurexins. In *Cell* (Vol. 81).
- Ichtchenko, K., Nguyen, T., & Südhof, T. C. (1996). Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *Journal of Biological Chemistry*, 271(5), 2676–2682. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.5.2676>
- Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T. W., & Südhof, T. C. (1997). *Binding of Neuroligins to PSD-95*. www.sciencemag.org
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., & Bourgeron, T. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics*, 34(1), 27–29. <https://doi.org/10.1038/ng1136>
- Jamain, S., Radyushkin, K., Hammerschmidt, K., Granon, S., Boretius, S., Varoqueaux, F., Ramanantsoa, N., Gallego, J., Ronnenberg, A., Winter, D., Frahm, J., Fischer, J., Bourgeron, T., Ehrenreich, H., & Brose, N. (2008). Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(5), 1710–1715.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0711555105>
- Jaramillo, T. C., Speed, H. E., Xuan, Z., Reimers, J. M., Escamilla, C. O., Weaver, T. P., Liu, S., Filonova, I., & Powell, C. M. (2017). Novel Shank3 mutant exhibits behaviors with

- face validity for autism and altered striatal and hippocampal function. *Autism Research*, 10(1), 42–65. <https://doi.org/10.1002/aur.1664>
- Jedlicka, P., Vnencak, M., Krueger, D. D., Jungnitz, T., Brose, N., & Schwarzacher, S. W. (2015). Neuroligin-1 regulates excitatory synaptic transmission, LTP and EPSP-spike coupling in the dentate gyrus in vivo. *Brain Structure and Function*, 220(1), 47–58. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0636-1>
- Jiang, M., Polepalli, J., Chen, L. Y., Zhang, B., Südhof, T. C., & Malenka, R. C. (2017). Conditional ablation of neuroligin-1 in CA1 pyramidal neurons blocks LTP by a cell-autonomous NMDA receptor-independent mechanism. *Molecular Psychiatry*, 22(3), 375–383. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.80>
- Jiang, Y., & Ehlers, M. D. (2013). Modeling Autism by SHANK Gene Mutations in Mice. *Neuron*, 78(1), 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.016>
- Jimenez, S., Baglietto-Vargas, D., Caballero, C., Moreno-Gonzalez, I., Torres, M., Sanchez-Varo, R., Ruano, D., Vizuete, M., Gutierrez, A., & Vitorica, J. (2008). Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP 751SL mouse model of Alzheimer's disease: Age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *Journal of Neuroscience*, 28(45), 11650–11661. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3024-08.2008>
- Kabir, M. T., Uddin, M. S., Setu, J. R., Ashraf, G. M., Bin-Jumah, M. N., & Abdel-Daim, M. M. (2020). Exploring the Role of PSEN Mutations in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. In *Neurotoxicity Research* (Vol. 38, Issue 4, pp. 833–849). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00232-x>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of neural science* (Mc Graw Hill, Ed.; 5th ed.).
- Khalaj, A. J., Sterky, F. H., Sclip, A., Schwenk, J., Brunger, A. T., Fakler, B., & Südhof, T. C. (2020). Deorphanizing FAM19A proteins as pan-neurexin ligands with an unusual biosynthetic binding mechanism. *Journal of Cell Biology*, 219(9). <https://doi.org/10.1083/jcb.202004164>
- Kim, H., Kim, D., Kim, J., Lee, H.-Y., Park, D., Kang, H., Matsuda, K., Sterky, F. H., Yuzaki, M., Kim, J. Y., Choi, S.-Y., Ko, J., & Um, J. W. (2020). Calsyntenin-3 interacts with both α - and β -neurexins in the regulation of excitatory synaptic innervation in specific

- Schaffer collateral pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 295(27), 9244–9262.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013077>
- Kim, H.-G., Kishikawa, S., Higgins, A. W., Seong, I.-S., Donovan, D. J., Shen, Y., Lally, E., Weiss, L. A., Najm, J., Kutsche, K., Descartes, M., Holt, L., Braddock, S., Troxell, R., Kaplan, L., Volkmar, F., Klin, A., Tsatsanis, K., Harris, D. J., ... Gusella, J. F. (2008). Disruption of Neurexin 1 Associated with Autism Spectrum Disorder. *The American Journal of Human Genetics*, 82(1), 199–207.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.011>
- Kim, J., Chakrabarty, P., Hanna, A., March, A., Dickson, D. W., Borchelt, D. R., Golde, T., & Janus, C. (2013). Normal cognition in transgenic BRI2-A β mice. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-15>
- Kim, J., Jung, S.-Y., Lee, Y. K., Park, S., Choi, J.-S., Lee, C. J., Kim, H.-S., Choi, Y.-B., Scheiffele, P., Bailey, C. H., Kandel, E. R., & Kim, J.-H. (2008). Neuroligin-1 is required for normal expression of LTP and associative fear memory in the amygdala of adult animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(26), 9087–9092.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0803448105>
- Kim, W. Y., & Shen, J. (2008). Presenilins are required for maintenance of neural stem cells in the developing brain. *Molecular Neurodegeneration*, 3(1).
<https://doi.org/10.1186/1750-1326-3-2>
- Kimberly, W. T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M. S., & Selkoe, D. J. (2000). The Transmembrane Aspartates in Presenilin 1 and 2 Are Obligatory for-Secretase Activity and Amyloid-Protein Generation* Downloaded from. In *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (Vol. 275, Issue 5). <http://www.jbc.org/>
- Klunk, W. E., Mathis, C. A., Price, J. C., DeKosky, S. T., Lopresti, B. J., Tsopelas, N. D., Saxton, J. A., & Nebes, R. D. (2009). Amyloid Imaging with PET in Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, and Clinically Unimpaired Subjects. In *PET in the Evaluation of Alzheimer's Disease and Related Disorders* (pp. 1–29). Springer New York.
https://doi.org/10.1007/b102284_6
- Ko, J., Fuccillo, M. v., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2009). LRRTM2 Functions as a Neurexin Ligand in Promoting Excitatory Synapse Formation. *Neuron*, 64(6), 791–798. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.012>

- Koehnke, J., Katsamba, P. S., Ahlsen, G., Bahna, F., Vendome, J., Honig, B., Shapiro, L., & Jin, X. (2010). Splice form dependence of β -neurexin/neuroigin binding interactions. *Neuron*, *67*(1), 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.001>
- Krueger, D. D., Tuffy, L. P., Papadopoulos, T., & Brose, N. (2012). The role of neurexins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses. *Current Opinion in Neurobiology*, *22*(3), 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.02.012>
- Kumar, A., Sidhu, J., Goyal, A., & Tsao, J. W. (2022). *Alzheimer Disease*.
- Laumonier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., Moizard, M.-P., Raynaud, M., Ronce, N., Lemonnier, E., Calvas, P., Laudier, B., Chelly, J., Fryns, J.-P., Ropers, H.-H., Hamel, B. C. J., Andres, C., Barthélémy, C., Moraine, C., & Briault, S. (2004). X-Linked Mental Retardation and Autism Are Associated with a Mutation in the NLGN4 Gene, a Member of the Neuroligin Family. *The American Journal of Human Genetics*, *74*(3), 552–557. <https://doi.org/10.1086/382137>
- Lee, K. J., Moussa, C. E. H., Lee, Y., Sung, Y., Howell, B. W., Turner, R. S., Pak, D. T. S., & Hoe, H. S. (2010). Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience*, *169*(1), 344–356. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.04.078>
- Lee, S.-J., Uemura, T., Yoshida, T., & Mishina, M. (2012). GluR 2 Assembles Four Neurexins into Trans-Synaptic Triad to Trigger Synapse Formation. *Journal of Neuroscience*, *32*(13), 4688–4701. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5584-11.2012>
- Lichtenthaler, S. F., Tschirner, S. K., & Steiner, H. (2022). Secretases in Alzheimer's disease: Novel insights into proteolysis of APP and TREM2. *Current Opinion in Neurobiology*, *72*, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.09.003>
- Lima, R. H., Rossato, J. I., Furini, C. R., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2009). Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks consolidation but not reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *91*(4), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.12.009>
- Long, J. M., & Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. In *Cell* (Vol. 179, Issue 2, pp. 312–339). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>

- Lowther, C., Speevak, M., Armour, C. M., Goh, E. S., Graham, G. E., Li, C., Zeesman, S., Nowaczyk, M. J. M., Schultz, L.-A., Morra, A., Nicolson, R., Bikangaga, P., Samdup, D., Zaazou, M., Boyd, K., Jung, J. H., Siu, V., Rajguru, M., Goobie, S., ... Bassett, A. S. (2017). Molecular characterization of NRXN1 deletions from 19,263 clinical microarray cases identifies exons important for neurodevelopmental disease expression. *Genetics in Medicine*, *19*(1), 53–61. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.54>
- Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, *25*(1), 103–126. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758>
- Marambaud, P., Wen, P. H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R., & Robakis, N. K. (2003). A CBP Binding Transcriptional Repressor Produced by the PS1/ε-Cleavage of N-Cadherin Is Inhibited by PS1 FAD Mutations. *Cell*, *114*(5), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2003.08.008>
- Martinez-Mir, A., González-Pérez, A., Gayán, J., Antúnez, C., Marín, J., Boada, M., Lopez-Arrieta, J. M., Fernández, E., Ramírez-Lorca, R., Sáez, M. E., Ruiz, A., Scholl, F. G., & Real, L. M. (2013). Genetic Study of Neurexin and Neuroligin Genes in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *35*(2), 403–412. <https://doi.org/10.3233/JAD-122257>
- Meckler, X., & Checler, F. (2016). Presenilin 1 and presenilin 2 target γ-secretase complexes to distinct cellular compartments. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(24), 12821–12837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708297>
- Miller, M. T., Mileni, M., Comoletti, D., Stevens, R. C., Harel, M., & Taylor, P. (2011). The crystal structure of the α-neurexin-1 extracellular region reveals a hinge point for mediating synaptic adhesion and function. *Structure*, *19*(6), 767–778. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.011>
- Minkeviciene, R., Rheims, S., Dobszay, M. B., Zilberter, M., Hartikainen, J., Fulop, L., Penke, B., Zilberter, Y., Harkany, T., Pitkanen, A., & Tanila, H. (2009). Amyloid - Induced Neuronal Hyperexcitability Triggers Progressive Epilepsy. *Journal of Neuroscience*, *29*(11), 3453–3462. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5215-08.2009>

- Missler, M., Zhang, W., Rohlmann, A., Kattenstroth, G., Hammer, R. E., Gottmann, K., & Südhof, T. C. (2003). α -Neurexins couple Ca^{2+} channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, *423*(6943), 939–948. <https://doi.org/10.1038/nature01755>
- Moehlmann, T., Winkler, E., Xia, X., Edbauer, D., Murrell, J., Capell, A., Kaether, C., Zheng, H., Ghetti, B., Haass, C., & Steiner, H. (2002). Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on $\text{A}\beta_{42}$ production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(12), 8025–8030. <https://doi.org/10.1073/pnas.112686799>
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.-Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., & McConlogue, L. (2000). High-Level Neuronal Expression of $\text{A}\beta_{1-42}$ in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaque Formation. *The Journal of Neuroscience*, *20*(11), 4050–4058. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04050.2000>
- Mumby, D. G., Tremblay, A., Lecluse, V., & Lehmann, H. (2005). Hippocampal damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Hippocampus*, *15*(8), 1050–1056. <https://doi.org/10.1002/hipo.20122>
- Naisbitt, S., Kim, E., Cheng Tu, J., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R. J., Worley, P. F., & Sheng, M. (1999). Shank, a Novel Family of Postsynaptic Density Proteins that Binds to the NMDA Receptor/PSD-95/GKAP Complex and Cortactin. In *Neuron* (Vol. 23). Kennedy.
- Naito, Y., Tanabe, Y., Lee, A. K., Hamel, E., & Takahashi, H. (2017). Amyloid- β Oligomers Interact with Neurexin and Diminish Neurexin-mediated Excitatory Presynaptic Organization. *Scientific Reports*, *7*. <https://doi.org/10.1038/srep42548>
- Nakanishi, M., Nomura, J., Ji, X., Tamada, K., Arai, T., Takahashi, E., Bućan, M., & Takumi, T. (2017). Functional significance of rare neuroligin 1 variants found in autism. *PLOS Genetics*, *13*(8), e1006940. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006940>
- Norstrom, E. M., Zhang, C., Tanzi, R., & Sisodia, S. S. (2010). Identification of NEEP21 as a β -Amyloid Precursor Protein-Interacting Protein In Vivo That Modulates Amyloidogenic Processing In Vitro. *Journal of Neuroscience*, *30*(46), 15677–15685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4464-10.2010>

- Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., & Haass, C. (2002). Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *The EMBO Journal*, *21*(20), 5408–5416. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf541>
- Papadopoulos, N., Suelves, N., Perrin, F., Vadukul, D. M., Vrancx, C., Constantinescu, S. N., & Kienlen-Campard, P. (2022). Structural Determinant of β -Amyloid Formation: From Transmembrane Protein Dimerization to β -Amyloid Aggregates. *Biomedicines*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112753>
- Pasciuto, E., Borrie, S. C., Kanellopoulos, A. K., Santos, A. R., Cappuyns, E., D'Andrea, L., Pacini, L., & Bagni, C. (2015). Autism Spectrum Disorders: Translating human deficits into mouse behavior. *Neurobiology of Learning and Memory*, *124*, 71–87. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.07.013>
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J. T., Wang, W., Wells, M. F., Venkatraman, T. N., Lascola, C. D., Fu, Z., & Feng, G. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, *472*(7344), 437–442. <https://doi.org/10.1038/nature09965>
- Peixoto, R. T., Kunz, P. A., Kwon, H., Mabb, A. M., Sabatini, B. L., Philpot, B. D., & Ehlers, M. D. (2012). Transsynaptic Signaling by Activity-Dependent Cleavage of Neuroligin-1. *Neuron*, *76*(2), 396–409. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.07.006>
- Pettem, K. L., Yokomaku, D., Luo, L., Linhoff, M. W., Prasad, T., Connor, S. A., Siddiqui, T. J., Kawabe, H., Chen, F., Zhang, L., Rudenko, G., Wang, Y. T., Brose, N., & Craig, A. M. (2013). The Specific α -Neurexin Interactor Calsyntenin-3 Promotes Excitatory and Inhibitory Synapse Development. *Neuron*, *80*(1), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.016>
- Pettem, K. L., Yokomaku, D., Takahashi, H., Ge, Y., & Craig, A. M. (2013). Interaction between autism-linked MDGAs and neuroligins suppresses inhibitory synapse development. *Journal of Cell Biology*, *200*(3), 321–336. <https://doi.org/10.1083/jcb.201206028>
- Philippe Marambaud, Junichi Shioi, Geo Serban, Anastasios Georgakopoulos, Shula Sarner, Vanja Nagy, Lia Baki, Paul Wen, Spiros Efthimiopoulos, Zhiping Shao, Thomas Wisniewski, & Nikolaos K Robakis. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens

- junctions. *The EMBO Journal*, 21(8), 1948–1956.
<https://doi.org/10.1093/emboj/21.8.1948>
- Pin, J. P., & Bettler, B. (2016). Organization and functions of mGlu and GABA B receptor complexes. In *Nature* (Vol. 540, Issue 7631, pp. 60–68). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nature20566>
- Polepalli, J. S., Wu, H., Goswami, D., Halpern, C. H., Südhof, T. C., & Malenka, R. C. (2017). Modulation of excitation on parvalbumin interneurons by neuroligin-3 regulates the hippocampal network. *Nature Neuroscience*, 20(2), 219–229.
<https://doi.org/10.1038/nn.4471>
- Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., Zhang, M., Paarmann, I., Fuchs, C., Harvey, K., Jedlicka, P., Schwarzacher, S. W., Betz, H., Harvey, R. J., Brose, N., Zhang, W., & Varoquaux, F. (2009). Neuroligin 2 Drives Postsynaptic Assembly at Perisomatic Inhibitory Synapses through Gephyrin and Collybistin. *Neuron*, 63(5), 628–642. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.023>
- Rabameda, L. G., Robles-Lanuza, E., Nieto-González, J. L., & Scholl, F. G. (2014). Neurexin Dysfunction in Adult Neurons Results in Autistic-like Behavior in Mice. *Cell Reports*, 8(2), 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.022>
- Rawat, P., Sehar, U., Bisht, J., Selman, A., Culberson, J., & Reddy, P. H. (2022). Phosphorylated Tau in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12841.
<https://doi.org/10.3390/ijms232112841>
- Reissner, C., Runkel, F., & Missler, M. (2013). *PROTEINFAMILYREVIEW Neurexins*.
<https://doi.org/10.1186/gb4128>
- Reissner, C., Stahn, J., Breuer, D., Klose, M., Pohlentz, G., Mormann, M., & Missler, M. (2014). Dystroglycan Binding to α -Neurexin Competes with Neurexophilin-1 and Neuroligin in the Brain. *Journal of Biological Chemistry*, 289(40), 27585–27603.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.595413>
- Ryman, D. C., Acosta-Baena, N., Aisen, P. S., Bird, T., Danek, A., Fox, N. C., Goate, A., Frommelt, P., Ghetti, B., Langbaum, J. B. S., Lopera, F., Martins, R., Masters, C. L., Mayeux, R. P., McDade, E., Moreno, S., Reiman, E. M., Ringman, J. M., Salloway, S., ... Bateman, R. J. (2014). Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease:

- A systematic review and meta-analysis. *Neurology*, 83(3), 253–260. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000596>
- Salmon, D. P., Heindel, W. C., Hamilton, J. M., Vincent Filoteo, J., Cidambi, V., Hansen, L. A., Masliah, E., & Galasko, D. (2015). Recognition memory span in autopsy-confirmed Dementia with Lewy Bodies and Alzheimer's Disease. *Neuropsychologia*, 75, 548–555. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2015.07.014>
- Sánchez-Hidalgo, A. C., Arias-Aragón, F., Romero-Barragán, M. T., Martín-Cuevas, C., Delgado-García, J. M., Martínez-Mir, A., & Scholl, F. G. (2022). Selective expression of the neurexin substrate for presenilin in the adult forebrain causes deficits in associative memory and presynaptic plasticity. *Experimental Neurology*, 347, 113896. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113896>
- Saura, C. A., Choi, S.-Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Rao, B. S. S., Chattarji, S., Kelleher, R. J., Kandel, E. R., Duff, K., Kirkwood, A., & Shen, J. (2004). Loss of Presenilin Function Causes Impairments of Memory and Synaptic Plasticity Followed by Age-Dependent Neurodegeneration. *Neuron*, 42(1), 23–36. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00182-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00182-5)
- Saura, C. A., Servián-Morilla, E., & Scholl, F. G. (2011). Presenilin/γ-secretase regulates neurexin processing at synapses. *PLoS ONE*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019430>
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., & Serafini, T. (2000). Neuroligin Expressed in Nonneuronal Cells Triggers Presynaptic Development in Contacting Axons. In *Cell* (Vol. 101).
- Scheltens, P., de Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10284, pp. 1577–1590). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews*, 81(2), 741–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.741>
- Servián-Morilla, E., Robles-Lanuza, E., Sánchez-Hidalgo, A. C., Camacho-García, R. J., Paez-Gomez, J. A., Mavillard, F., Saura, C. A., Martínez-Mir, A., & Scholl, F. G. (2018). Proteolytic processing of neurexins by presenilins sustains synaptic vesicle release.

- Journal of Neuroscience*, 38(4), 901–917. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1357-17.2017>
- Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J., & Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS Defects in Presenilin-1-Deficient Mice. *Cell*, 89(4), 629–639. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80244-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80244-5)
- Shen, J., & Kelleher III, R. J. (2007). *The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: Evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0608332104
- Shipman, S. L., & Nicoll, R. A. (2012). A Subtype-Specific Function for the Extracellular Domain of Neuroligin 1 in Hippocampal LTP. *Neuron*, 76(2), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.07.024>
- Siddiqui, T. J., Pancaroglu, R., Kang, Y., Rooyakkers, A., & Craig, A. M. (2010). LRRTMs and Neuroligins Bind Neurexins with a Differential Code to Cooperate in Glutamate Synapse Development. *Journal of Neuroscience*, 30(22), 7495–7506. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0470-10.2010>
- Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., & Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(7), 490–502. <https://doi.org/10.1038/nrn2851>
- Singh, S. K., Stogsdill, J. A., Pulimood, N. S., Dingsdale, H., Kim, Y. H., Pilaz, L.-J., Kim, I. H., Manhaes, A. C., Rodrigues, W. S., Pamukcu, A., Enustun, E., Ertuz, Z., Scheiffele, P., Soderling, S. H., Silver, D. L., Ji, R.-R., Medina, A. E., & Eroglu, C. (2016). Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging NRX1 α and NL1 via Hevin. *Cell*, 164(1–2), 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.034>
- Song, J.-Y., Ichtchenko, K., Südhof, T. C., & Brose, N. (1999). *Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses* (Vol. 96). www.pnas.org
- Stanga, S., Vrancx, C., Tasiaux, B., Marinangeli, C., Karlström, H., & Kienlen-Campard, P. (2018a). Specificity of presenilin-1- and presenilin-2-dependent γ -secretases towards substrate processing. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(2), 823–833. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13364>
- Stanga, S., Vrancx, C., Tasiaux, B., Marinangeli, C., Karlström, H., & Kienlen-Campard, P. (2018b). Specificity of presenilin-1- and presenilin-2-dependent γ -secretases

- towards substrate processing. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(2), 823–833. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13364>
- Stefan Butz, Masaya Okamoto, & Thomas C. Südhof. (1998). *A Tripartite Protein Complex with the Potential to Couple Synaptic Vesicle Exocytosis to Cell Adhesion in Brain*.
- Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M. G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fechteler, K., Citron, M., Kopan, R., Pesold, B., Keck, S., Baader, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Baumeister, R., & Haass, C. (1999). A Loss of Function Mutation of Presenilin-2 Interferes with Amyloid β -Peptide Production and Notch Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28669–28673. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28669>
- Sterky, F. H., Trotter, J. H., Lee, S. J., Recktenwald, C. v., Du, X., Zhou, B., Zhou, P., Schwenk, J., Fakler, B., & Südhof, T. C. (2017). Carbonic anhydrase-related protein CA10 is an evolutionarily conserved pan-neurexin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7), E1253–E1262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621321114>
- Strassnig, M., & Ganguli, M. (2005). About a peculiar disease of the cerebral cortex: Alzheimer's original case revisited. *Psychiatry (Edgmont (Pa. : Township))*, 2(9), 30–33.
- Struhl, G., & Adachi, A. (2000). Requirements for Presenilin-Dependent Cleavage of Notch and Other Transmembrane Proteins. In *Struhl and Greenwald* (Vol. 6).
- Südhof, T. C. (2008). Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, 455(7215), 903–911. <https://doi.org/10.1038/nature07456>
- Südhof, T. C. (2012). The presynaptic active zone. In *Neuron* (Vol. 75, Issue 1, pp. 11–25). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>
- Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron*, 80(3), 675–690. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>
- Südhof, T. C. (2017). Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. In *Cell* (Vol. 171, Issue 4, pp. 745–769). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.024>
- Sun, L., Zhou, R., Yang, G., & Shi, Y. (2017). Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A β 42 and A β 40 peptides by γ -secretase.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(4), E476–E485. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618657114>
- Suzuki, K., Hayashi, Y., Nakahara, S., Kumazaki, H., Prox, J., Horiuchi, K., Zeng, M., Tanimura, S., Nishiyama, Y., Osawa, S., Sehara-Fujisawa, A., Saftig, P., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Matsuki, N., Koyama, R., Tomita, T., & Iwatsubo, T. (2012). Activity-Dependent Proteolytic Cleavage of Neuroligin-1. *Neuron*, 76(2), 410–422. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.003>
- Tabuchi, K., Chen, G., Sudhof, T. C., & Shen, J. (2009). Conditional Forebrain Inactivation of Nicastrin Causes Progressive Memory Impairment and Age-Related Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 29(22), 7290–7301. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1320-09.2009>
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., & Ihara, Y. (2009). gamma-Secretase: Successive Tripeptide and Tetrapeptide Release from the Transmembrane Domain of beta-Carboxyl Terminal Fragment. *Journal of Neuroscience*, 29(41), 13042–13052. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2362-09.2009>
- Tambini, M. D., & D’Adamio, L. (2020). Knock-in rats with homozygous PSEN1 Alzheimer mutation are viable and show selective γ -secretase activity loss causing low A β 40/42 and high A β 43. *Journal of Biological Chemistry*, 295(21), 7442–7451. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012542>
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., & Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in alzheimer’s disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 30(4), 572–580. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>
- Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A. I., Gandy, S. E., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., & Price, D. L. (1996). Endoproteolysis of Presenilin 1 and Accumulation of Processed Derivatives In Vivo. In *Neuron* (Vol. 17).
- Tristán-Clavijo, E., Camacho-García, R. J., Robles-Lanuza, E., Ruiz, A., van der Zee, J., van Broeckhoven, C., Hernandez, I., Martínez-Mir, A., & Scholl, F. G. (2015). A truncating mutation in Alzheimer’s disease inactivates neuroligin-1 synaptic function.

- Neurobiology of Aging*, 36(12), 3171–3175.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.09.004>
- Tromp, A., Mowry, B., & Giacomotto, J. (2021). Neurexins in autism and schizophrenia—a review of patient mutations, mouse models and potential future directions. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 26, Issue 3, pp. 747–760). Springer Nature.
<https://doi.org/10.1038/s41380-020-00944-8>
- Tzeng, T.-C., Hasegawa, Y., Iguchi, R., Cheung, A., Caffrey, D. R., Thatcher, E. J., Mao, W., Germain, G., Tamburro, N. D., Okabe, S., Heneka, M. T., Latz, E., Futai, K., & Golenbock, D. T. (2018). Inflammasome-derived cytokine IL18 suppresses amyloid-induced seizures in Alzheimer-prone mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(36), 9002–9007. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801802115>
- Uchigashima, M., Cheung, A., Suh, J., Watanabe, M., & Futai, K. (2019). Differential expression of neurexin genes in the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 527(12), 1940–1965. <https://doi.org/10.1002/cne.24664>
- Ullrich, B., Ushkaryov, Y. A., & Südhof, T. C. (1995). Cartography of Neurexins: More Than 1000 Isoforms Generated by Alternative Splicing and Expressed in Distinct Subsets of Neurons. In *Neuron* (Vol. 4).
- Ushkaryov, Y. A., Hata, Y., Ichtchenko, K., Moomaw, C., Afendis, S., Slaughter, C. A., & Südhof, T. C. (1994). Conserved domain structure of β -neurexins. Unusual cleaved signal sequences in receptor-like neuronal cell-surface proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 269(16), 11987–11992. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)32671-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)32671-6)
- Ushkaryov, Y. A., Petrenko, A. G., Geppert, M., & Südhof, T. C. (1992). Neurexins: Synaptic Cell Surface Proteins Related to the α -Latrotoxin Receptor and Laminin. *Science*, 257(5066), 50–56. <https://doi.org/10.1126/science.1621094>
- Ushkaryov, Y. A., & Südhof, T. C. (1993). Neurexin IIIa: Extensive alternative splicing generates membrane-bound and soluble forms. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 90).
- Varoquaux, F., Jamain, S., & Brose, N. (2004). Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *European Journal of Cell Biology*, 83(9), 449–456. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00410>

- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., ... Citron, M. (1999). β -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science*, 286(5440), 735–741. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>
- Viggiano, M. P., Galli, G., Righi, S., Brancati, C., Gori, G., & Cincotta, M. (2008). Visual Recognition Memory in Alzheimer's Disease: Repetition-Lag Effects. *Experimental Aging Research*, 34(3), 267–281. <https://doi.org/10.1080/03610730802070241>
- Vogel-Ciernia, A., & Wood, M. A. (2014). Examining Object Location and Object Recognition Memory in Mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 69(1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69>
- Wang, Z., Yang, L., & Zheng, H. (2012). Role of APP and AB in Synaptic Physiology. *Current Alzheimer Research*, 9(2), 217–226. <https://doi.org/10.2174/156720512799361691>
- Watanabe, H., Iqbal, M., Zheng, J., Wines-Samuelson, M., & Shen, J. (2014). Partial Loss of Presenilin Impairs Age-Dependent Neuronal Survival in the Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, 34(48), 15912–15922. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3261-14.2014>
- Weihofen, A., & Martoglio, B. (2003). Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends in Cell Biology*, 13(2), 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)00041-7](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)00041-7)
- Wines-Samuelson, M., Schulte, E. C., Smith, M. J., Aoki, C., Liu, X., Kelleher, R. J., & Shen, J. (2010). Characterization of Age-Dependent and Progressive Cortical Neuronal Degeneration in Presenilin Conditional Mutant Mice. *PLoS ONE*, 5(4), e10195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010195>
- Winters, B. D., Forwood, S. E., Cowell, R. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2004). Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(26), 5901–5908. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1346-04.2004>

- Wiśniowiecka-Kowalnik, B., Nesteruk, M., Peters, S. U., Xia, Z., Cooper, M. L., Savage, S., Amato, R. S., Bader, P., Browning, M. F., Haun, C. L., Duda, A. W., Cheung, S. W., & Stankiewicz, P. (2010). Intragenic rearrangements in *NRXN1* in three families with autism spectrum disorder, developmental delay, and speech delay. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 9999B, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31064>
- Wolfe, M. S., & Miao, Y. (2022). Structure and mechanism of the γ -secretase intramembrane protease complex. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 74). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102373>
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., & Selkoe, D. J. (1999). 2 transmembrane aspartates in ps1 required for ps endoproteolysis and g-secretase activity. *Nature*, 398(672), 513–517.
- Wu, X., Morishita, W. K., Riley, A. M., Hale, W. D., Südhof, T. C., & Malenka, R. C. (2019). Neuroligin-1 Signaling Controls LTP and NMDA Receptors by Distinct Molecular Pathways. *Neuron*, 102(3), 621-635.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.013>
- Xia, D., Kelleher, R. J., & Shen, J. (2016). Loss of A β 43 Production Caused by Presenilin-1 Mutations in the Knockin Mouse Brain. *Neuron*, 90(2), 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.009>
- Xia, D., Watanabe, H., Wu, B., Lee, S. H., Li, Y., Tsvetkov, E., Bolshakov, V. Y., Shen, J., & Kelleher, R. J. (2015). Presenilin-1 Knockin Mice Reveal Loss-of-Function Mechanism for Familial Alzheimer's Disease. *Neuron*, 85(5), 967–981. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.010>
- Yan, J., Oliveira, G., Coutinho, A., Yang, C., Feng, J., Katz, C., Sram, J., Bockholt, A., Jones, I. R., Craddock, N., Cook, E. H., Vicente, A., & Sommer, S. S. (2005). Analysis of the neuroligin 3 and 4 genes in autism and other neuropsychiatric patients. *Molecular Psychiatry*, 10(4), 329–332. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001629>
- Zhang, C., Milunsky, J. M., Newton, S., Ko, J., Zhao, G., Maher, T. A., Tager-Flusberg, H., Bolliger, M. F., Carter, A. S., Boucard, A. A., Powell, C. M., & Südhof, T. C. (2009). A Neuroligin-4 Missense Mutation Associated with Autism Impairs Neuroligin-4 Folding and Endoplasmic Reticulum Export. *The Journal of Neuroscience*, 29(35), 10843–10854. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1248-09.2009>

- Zhang, H., Liu, J., Sun, S., Pchitskaya, E., Popugaeva, E., & Bezprozvanny, I. (2015). Calcium Signaling, Excitability, and Synaptic Plasticity Defects in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *45*(2), 561–580. <https://doi.org/10.3233/JAD-142427>
- Zhang, H., Sun, S., Herreman, A., de Strooper, B., & Bezprozvanny, I. (2010). Role of Presenilins in Neuronal Calcium Homeostasis. *Journal of Neuroscience*, *30*(25), 8566–8580. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1554-10.2010>
- Zhang, S., Zhang, M., Cai, F., & Song, W. (2013). Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis. In *Translational Neurodegeneration* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/2047-9158-2-15>