



Papel de beta-neurexinas en la formación y maduración del circuito sináptico y su disfunción en enfermedades mentales

Estefanía Robles Lanuza

Tesis Doctoral

Sevilla 2017

Memoria presentada por Estefanía Robles Lanuza 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 supervisión del Doctor Francisco Gómez Scholl.

Estefanía Robles Lanuza ha recibido financiación del V Plan Propio de la Universidad de Sevilla, con un Contrato predoctoral o de Personal Investigador en Formación (PIF), para el desarrollo del Programa Propio I+D+i de la Universidad de Sevilla.

El proyecto de investigación ha recibido financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2015-71464-R), del Ministerio de Ciencia e Innovación (Instituto de Salud Carlos III) (PI11/01058) y de la Junta de Andalucía (P11-CVI-7599).

I.	INTRODUCCIÓN.....	8
1.	Circuitos sinápticos	8
1.1	Estructura y función de las sinapsis	8
1.2	Establecimiento y plasticidad de los circuitos sinápticos.....	9
2.	Las Neurexinas	10
2.1	NLs como ligandos postsinápticos de Nrnxns	12
2.2	Capacidad sinaptogénica de la ruta Nrnxns/NLs.....	12
2.3	Código transináptico mediado por Nrnxns y NLs.....	13
2.4	Funciones de Nrnxns y NLs <i>in vivo</i>	16
2.5	Papel de Nrnxns/NLs en la modulación del sistema endocannabinoide (eCB).....	17
3.	Trastornos del espectro autista	18
3.1	Descripción clínica y epidemiológica del TEA	18
3.2	Hipótesis del origen del TEA	19
3.3	Base genética del TEA	20
3.4	Convergencia en rutas de genes asociados al TEA.....	21
3.5	Alteraciones genéticas en la ruta de Nrnxns asociadas con TEA	21
3.6	Regiones y rutas cerebrales implicadas en TEA	22
3.7	Desbalance E/I como elemento común en TEA	24
4.	Utilización de animales de experimentación para modelar el TEA	24
4.1	Modelos animales de autismo	25
4.2	Evaluación del comportamiento asociado a TEA en ratones.....	26
4.2.1	Análisis de patrones repetitivos de conductas y actividades.....	26
4.2.2	Evaluación de los déficits en interacción social	27
4.2.3	Evaluación de los defectos en la comunicación social	27
II.	ANTECEDENTES DEL PROYECTO.....	29
1.	Mutaciones específicas de βNrxn1 en pacientes con autismo.....	29
2.	Generación de un ratón mutante para modelar la disfunción de βNrxn1.....	29
3.	Caracterización y efectos del mutante HA-βNrx1ΔC <i>in vitro</i>	31
4.	Generación de un ratón transgénico del mutante HA-βNrx1ΔC	35

III.	OBJETIVOS.....	38
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1.	Cultivos celulares	39
1.1	Mantenimiento de células HEK293T.....	39
1.2	Transfección de células HEK293T.....	39
1.3	Producción lentiviral	39
1.4	Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata	40
1.5	Infección de cultivos neuronales	41
2.	Aspectos generales derivados del trabajo con un modelo animal	41
2.1	Normativa del uso de animales de experimentación	41
2.2	Procedencia de la línea de ratones β Nrx1 Δ C.....	42
2.3	Extracción de DNA y genotipado de ratones	43
3.	Experimentos de comportamiento en ratones	43
3.1	Análisis SHIRPA	44
3.2	Test de campo abierto	44
3.4	Reconocimiento de nuevos objetos.....	45
3.5	Test de <i>self-grooming</i>	45
3.6	Prueba de sociabilidad <i>3-chamber</i>	46
3.7	Test de habituación/deshabituación de la olfacción	46
3.8	Test de enterramiento de comida	47
4.	Técnicas bioquímicas para el análisis de proteínas	47
4.1	Análisis de los niveles de proteínas mediante <i>western blot</i>	47
4.1.1	Obtención de lisados a partir de tejido	47
4.1.2	Obtención de lisados a partir de cultivos celulares.....	48
4.1.3	Electroforesis y transferencia de las proteínas	48
4.2	Inmunoprecipitaciones de tejido	50
4.3	Fraccionamiento subcelular de sinaptosomas.....	50
4.4	Proteómica cuantitativa mediante iTRAQ de sinaptosomas	52
5.	Análisis histológicos	53
5.1	Análisis de proteínas en cortes de tejido	53
5.1.1	Perfusión transcardíaca y seccionamiento del tejido	53
5.1.2	Inmunofluorescencia de tejido	54
5.1.3	Inmunohistoquímica	54

5.2	Tinción de Golgi-Cox	55
5.2.1	Preparación de las muestras	55
5.2.2	Toma de imágenes y análisis cuantitativo de espinas dendríticas	55
6.	Análisis de la expresión génica	56
6.1	Extracción RNA.....	56
6.2	Análisis del transcriptoma.....	56
6.3	RT-qPCR.....	57
7.	Determinación de los niveles de eCBs.....	58
8.	Cirugía para inyección lentiviral por estereotaxia.....	59
9.	Experimentos de electrofisiología.....	60
9.1	Electrofisiología en rodajas	60
9.2	Registro de LFP <i>in vivo</i>	61
9.2.1	Preparación de los electrodos y cirugía para la implantación.....	61
9.2.2	Adaptación del test de <i>3-chamber</i> para el registro <i>in vivo</i>	62
9.2.3	Registro y análisis de LFP.....	63
10.	Anticuerpos utilizados.....	64
11.	Plásmidos utilizados	65
V.	RESULTADOS	66
1.	Caracterización de la expresión del mutante HA-βNrx1ΔC <i>in vivo</i> en el ratón doble transgénico βNrx1ΔC.....	66
1.1.	Expresión espacio-temporal de la proteína HA- β Nrx1 Δ C <i>in vivo</i>	66
1.2.	Control temporal de la expresión de HA- β Nrx1 Δ C con Dox.....	71
1.3.	Expresión sináptica del mutante HA- β Nrx1 Δ C	74
1.4.	Registro electrofisiológico de las corrientes postsinápticas espontáneas en miniatura en rodajas de cerebro.....	77
2.	Caracterización fenotípica del comportamiento del ratón βNrx1ΔC.....	79
2.1.	Evaluación general del estado del animal	79
2.2.	Análisis de la locomoción exploratoria. Test de campo abierto.....	80
2.3.	Evaluación de la capacidad de locomoción forzada y aprendizaje motor. Prueba de <i>rotarod</i>	81
2.4.	Evaluación de la memoria de reconocimiento	82
2.5.	Caracterización del comportamiento relacionado con autismo en ratones machos.....	83

2.5.1	Análisis del comportamiento repetitivo con el <i>self-grooming</i> test.....	84
2.5.2	Análisis de la interacción social con la prueba de sociabilidad <i>3-chamber</i>	85
2.5.3	Análisis de la comunicación social con el test de habituación/deshabituación de la olfacción	87
2.6.	Re-evaluación de las pruebas asociadas a los síntomas del TEA en cohortes independientes de ratones machos	89
2.7.	Análisis de la reversión de los defectos asociados con el TEA	92
2.8.	Análisis de comportamiento social en hembras del modelo de autismo β Nrx1 Δ C	96
3.	Posibles mecanismos afectados en el modelo βNrx1ΔC.....	100
3.1.	Análisis de los niveles de proteínas sinápticas candidatas.....	100
3.2.	Análisis de la densidad de espinas dendríticas.....	105
3.2.1	Corteza somatosensorial primaria	105
3.2.2	Estriado dorsal	107
3.3.	Análisis de los niveles de eCBs y compuestos relacionados en muestras de corteza	109
3.4.	Análisis de cambios en la expresión génica.....	113
3.4.1.	Análisis de enriquecimiento ontológico de genes	114
3.4.2.	Validación y replicación de los cambios en expresión génica por RT-qPCR.....	115
3.5.	Análisis de la localización genómica del sitio de inserción de los transgenes TRE-HA- β Nrx1 Δ C y CaMKII-tTA	118
3.6.	Re-clasificación de los cambios de expresión génica	126
3.7.	Genes regulados por actividad sináptica: <i>Nr4a1</i> , <i>Arc</i> y <i>Fos</i>	127
4.	Circuitos sinápticos implicados en el fenotipo relacionado con el autismo en el modelo βNrx1ΔC 130	
4.1.	Interacción de ligandos sinápticos con el mutante HA- β Nrx1 Δ C.....	130
4.1.1.	Análisis de los ligandos sinápticos asociados a HA- β Nrx1 Δ C	131
4.1.2	Confirmación de los ligandos sinápticos asociados a HA- β Nrx1 Δ C mediante IP de NL	136
4.1.3.	Análisis de las interacciones tempranas mediadas por el mutante HA- β Nrx1 Δ C.....	138
4.2.	Análisis de los circuitos cerebrales relacionados con la interacción social y afectados por el comportamiento asociado al TEA.....	140
4.2.1.	Estructuras cerebrales seleccionadas para el registro electrofisiológico <i>in vivo</i>	140
4.2.2.	Estudio del comportamiento social durante el registro electrofisiológico <i>in vivo</i>	142
4.2.3.	Comprobación de las coordenadas de registro electrofisiológico y expresión comparativa del mutante HA- β Nrx1 Δ C	146
4.2.4.	Resultados del registro electrofisiológico <i>in vivo</i>	148
4.3.	Diseción de los circuitos cerebrales implicados en el comportamiento asociado al TEA	152
4.3.1	Inyección estereotáxica de HA- β Nrx1 Δ C para generar la disfunción local de β Nrx.....	153

4.3.2	Análisis del comportamiento asociado al autismo en ratones con disfunción local de β Nrxn1	155
.....		
VI.	DISCUSIÓN	158
1.	Disfunción de circuitos postnatales como causa de los síntomas del autismo	158
2.	Defectos sinápticos implicados en la generación del comportamiento asociado al autismo	163
3.	Identificación de mecanismos afectados como posibles dianas terapéuticas para el TEA	166
4.	Diseción de circuitos cerebrales implicados en la interacción social y en el establecimiento de comportamientos asociados al autismo	168
5.	Modelo de trabajo	170
.....		
VII.	CONCLUSIONES	173
.....		
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	175
.....		
IX.	ANEXOS	195
1.	Análisis proteómico de sinaptosomas mediante iTRAQ	195
	Anexo 1.1. Proteínas con mayores cambios de expresión en sinaptosomas de ratones β Nrx1 Δ C	195
	Anexo 1.2. Enriquecimiento en rutas KEGG en el experimento de iTRAQ en sinaptosomas	199
	Anexo 1.3. Proteínas asociadas a algunas de las rutas más enriquecidas en el experimento de iTRAQ en sinaptosomas	201
2.	Ontología génica de los genes con expresión alterada en el <i>array</i>	183
	Anexo 2. Ontología génica de los genes que superan el umbral $0.8 > FC > 1.20$ en el <i>array</i>	183
3.	Secuencias Sanger de la inserción del transgén TRE-HA-βNrx1ΔC	184
	Anexo 3.1. Secuencia de la inserción del extremo 5' del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C en el genoma de ratón	184
	Anexo 3.2. Secuencia de la inserción del extremo 3' del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C en el genoma de ratón	185
4.	Abreviaturas	186

I. INTRODUCCIÓN

1. Circuitos sinápticos

1.1 Estructura y función de las sinapsis

Las neuronas del cerebro de los mamíferos se conectan formando redes funcionales de comunicación con trillones de conexiones llamadas sinapsis. La disfunción de estos circuitos neuronales subyace a numerosas enfermedades mentales que pueden manifestarse en la infancia temprana o en edades avanzadas. La sinapsis presenta una estructura asimétrica, que distingue el terminal presináptico —donde se localiza la maquinaria de liberación de neurotransmisor— y el terminal postsináptico —que presenta los receptores de neurotransmisores— (figura 1) (Südhof et al., 2001). La región del terminal presináptico involucrada en la liberación de neurotransmisores se denomina zona activa (Figura 1). En esta región se concentran los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, que se abren con la llegada de un potencial de acción. La entrada de Ca^{2+} provoca la liberación de los neurotransmisores, empaquetados en vesículas sinápticas. Tras atravesar la hendidura sináptica, los neurotransmisores se unen a receptores específicos presentes en la membrana del terminal postsináptico, que modulan la conductancia a iones. Con este proceso, la sinapsis transforma información eléctrica en química de forma extremadamente rápida (Südhof et al., 2011).

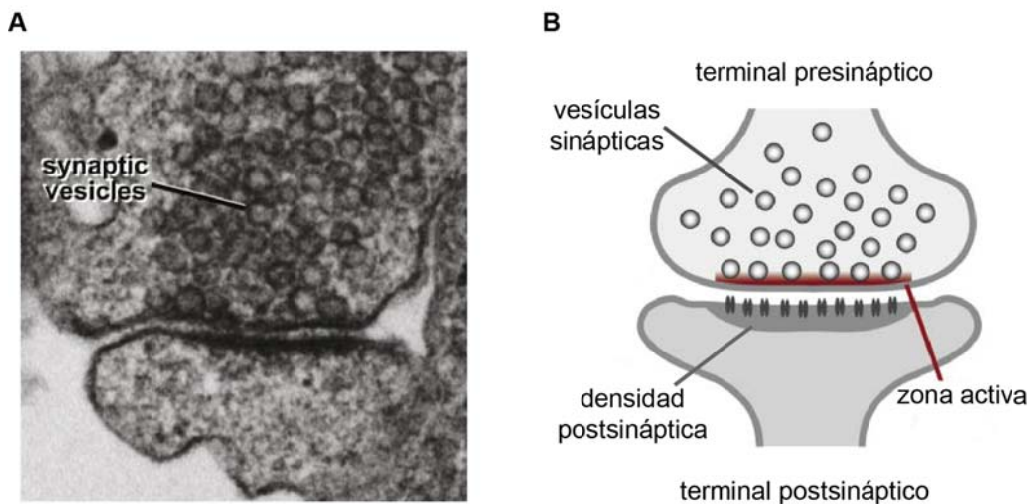


Figura 1. Estructura de la sinapsis. A. Fotografía de microscopía electrónica. Escala 200nm. B. Diagrama esquemático de la estructura sináptica general. (Modificado de Südhof, 2012).

Cada neurona libera solamente un tipo de neurotransmisor, de los cuales glutamato y GABA (*gamma-aminobutyric acid*) son los principales neurotransmisores excitatorios e inhibitorios, respectivamente (Kandel et al., 2013). Estos neurotransmisores poseen receptores específicos situados en el terminal postsináptico, que según su mecanismo de acción se clasifican en receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos conforman canales iónicos que se abren con la unión del neurotransmisor, produciendo respuestas sinápticas rápidas. A ellos pertenecen los receptores glutamatérgicos tipo AMPA, NMDA y kainato y los receptores GABAérgicos GABA_A. Por otra parte, los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G y regulan indirectamente enzimas y canales iónicos. Entre ellos se encuentran las familias de los receptores mGlu y GABA_B (Pin et al., 2016). La activación de los receptores postsinápticos modula la excitabilidad de la neurona postsináptica y regula el balance excitación/inhibición (E/I) de los circuitos neuronales.

Las especializaciones de membrana pre- y postsináptica deben estar yuxtapuestas de manera precisa para asegurar la eficacia en la neurotransmisión y emparejadas correctamente de acuerdo al neurotransmisor liberado (Kandel et al., 2013). A ello contribuyen moléculas de adhesión transsináptica que organizan complejos proteicos a ambos lados de la sinapsis.

1.2 Establecimiento y plasticidad de los circuitos sinápticos

La formación de sinapsis o sinaptogénesis es un proceso altamente específico que depende de un conjunto de señales secuenciales y jerarquizadas (Scheiffele, 2003). En una primera etapa durante el desarrollo, el tránsito del axón hacia sus zonas diana se establecen por un balance de señales de atracción y repulsión mediadas por moléculas secretadas y de membrana. Posteriormente, se forman conexiones sinápticas coordinadas por interacciones entre moléculas de adhesión pre- y postsinápticas. Durante la última fase tiene lugar un refinamiento de los circuitos sinápticos según su actividad. En este momento, las conexiones más competitivas se estabilizan y el resto se eliminan mediante el *pruning* o la poda

sináptica (Schuldiner et al., 2015). El refinamiento del circuito sináptico por mecanismos mediados por actividad no se restringe al desarrollo, sino que se extiende a etapas posteriores de la vida adulta.

Como consecuencia, los mecanismos que regulen la formación y la función de las sinapsis deben asegurar el establecimiento del circuito sináptico de una forma estereotipada durante el desarrollo, pero también ser capaces de responder a mecanismos regulados por actividad que modulan la función del circuito sináptico. Por ello, las proteínas implicadas en la organización de complejos multiproteicos en las sinapsis pueden ejercer funciones importantes que se extiendan a etapas más allá del desarrollo temprano. En este sentido, experimentos de deprivación sensorial durante etapas postnatales tempranas han llevado a definir periodos críticos que presentan una mayor plasticidad postnatal (Hensch, 2005). Sin embargo, los circuitos sinápticos son sensibles a cambios de actividad también durante la etapa adulta, regulando eventos de plasticidad sináptica que modifican los circuitos neuronales responsables de funciones cognitivas superiores, como el aprendizaje y la memoria (Froemke et al., 2015).

Las proteínas que median adhesión sináptica se encuentran perfectamente diseñadas para regular el funcionamiento correcto del circuito sináptico, ya que pueden establecer mecanismos específicos de reconocimiento que aseguren el ensamblaje de tipos diferentes de sinapsis en los sitios de contacto y, a su vez, proporcionar mecanismos de regulación de la maquinaria pre- y postsináptica. Entre estos complejos de adhesión transináptica destaca por su relevancia el sistema formado por Neurexinas (Nrxns) y Neuroliginas (NLs).

2. Las Neurexinas

Las Nrxns son proteínas transmembrana involucradas en el establecimiento, maduración y función de la sinapsis. Se descubrieron como receptores de α -latrotoxina, un componente del veneno de la araña viuda negra que provoca la liberación masiva de neurotransmisores (Ushkaryov et al., 1992). Las Nrxns están codificadas por 3 genes (*NRXN1-3*) con dos promotores alternativos que dan lugar a las isoformas largas (α Nrxns) y a las isoformas

cortas (β Nrxns) (Figura 2). Todas las Nrxns constan de un dominio N-terminal extracelular, un segmento transmembrana y una cola citoplásmica muy conservada entre los diferentes genes. Las isoformas α Nrxns y β Nrxns comparten el dominio intracelular y transmembrana pero difieren en su dominio extracelular. Las isoformas α Nrxns contienen seis dominio LNS (del inglés *laminin-neurexin-sex hormone binding globulin*) y tres dominios EGF (del inglés *epidermal growth factor-like*) intercalados en su dominio extracelular (Figura 2). Las β Nrxns, utilizan un promotor exclusivo y tienen un exón específico que contiene el sitio de inicio de traducción único no compartido por α Nrxns seguido por el último dominio LNS común con α Nrxns (Figura 2).

Los genes *NRXN1-3* tienen hasta seis sitios canónicos de *splicing* alternativo (AS) en su dominio extracelular que incrementan exponencialmente el abanico de isoformas posibles de Nrxns (Schreiner et al., 2014; Ushkaryov et al., 1992). Los sitios AS4 y AS5 están presentes en α Nrxns y β Nrxns, mientras que el resto se encuentran sólo en α Nrxn (Figura 2). La incorporación o la exclusión de los exones situados en estos sitios de *splicing* alternativo origina la formación de isoformas AS+ o AS-, respectivamente.

En el extremo C-terminal las Nrxns presentan un sitio de unión a dominios PDZ, a través del cual interaccionan con proteínas de andamiaje del terminal presináptico, como Cask (Butz et al., 1998).

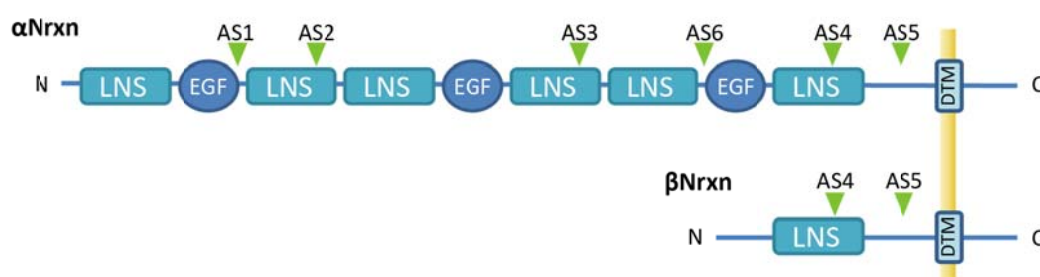


Figura 2. Representación esquemática de los dominios de las proteínas α Nrxns y β Nrxns. Promotores alternativos generan isoformas α Nrxns y β Nrxns. Recientemente se ha descubierto un promotor alternativo situado 3' que da lugar a isoformas γ Nrxn1 (Sterky et al., 2017). Se representan en verde los sitios de *splicing* alternativo y en beige la membrana citoplásmica.

2.1 NLs como ligandos postsinápticos de Nrns

Las NLs se descubrieron como receptores de Nrns (Ichtchenko et al., 1995). Existen cinco genes de NLs en humano (*NLGN1-4X* y *4Y*) y cuatro en ratón (*NLGN1-4*). Las NLs contienen un corto dominio intracelular con secuencias de unión a dominios PDZ, un segmento transmembrana y un dominio extracelular con una región homóloga a acetilcolinesterasa no activa (Figura 3). El dominio extracelular de NL1-3 sufre fenómenos de *splicing* alternativo en los sitios A y B, este último exclusivo de NL1 (Ichtchenko et al., 1995).

En el dominio C-terminal las NLs contienen un sitio de unión a dominios PDZ a través del cual median interacciones con proteínas de andamiaje del terminal postsináptico, como PSD-95 o Gefirina.



Figura 3. Representación esquemática de los dominios de las proteínas NL. Se representan en rojo los sitios de *splicing* alternativo y en beige la membrana citoplásmica.

Las Nrns median adhesiones heterofílicas con NLs (Nguyen et al., 1997). La capacidad de formar complejos de adhesión heterofílicos entre Nrns y NL1, junto a la interacción con proteínas sinápticas, sugirió un papel del sistema de Nrns/NLs en la función y establecimiento de las sinapsis.

2.2 Capacidad sinaptogénica de la ruta Nrns/NLs

Estudios publicados a comienzos de los años 2000 demostraron una función del sistema de Nrns/NLs en la formación de sinapsis, identificando por primera vez un sistema con capacidad sinaptogénica (Scheiffele et al., 2000). La expresión de NL1 en células no neuronales produce en los axones de las neuronas que las contactan el ensamblaje de terminales presinápticos funcionales que liberan neurotransmisor (Scheiffele et al., 2000). De igual forma, la expresión de NL1 en neuronas en cultivo induce el reclutamiento

presináptico de Nrns endógenas e incrementa el número de sinapsis (Dean et al., 2003). La actividad sinaptogénica de NL1 se reduce por la presencia del dominio extracelular soluble de β Nrxn1 y se inhibe por mutantes de NL1 que no se adhieren a β Nrxn1 (Dean et al., 2003; Scheiffele et al., 2000). Además, el reclutamiento artificial de β Nrxn1, sin la intervención de NL1, provoca la concentración de vesículas sinápticas en los axones (Dean et al., 2003). Mediante esta ruta bidireccional, la expresión de NLS en la neurona postsináptica induce el reclutamiento de neurexinas presinápticas, que forman sitios de nucleación en la membrana, y el ensamblaje de terminales pre- y postsinápticos en los sitios de contacto. El efecto de la sobreexpresión de NL1 contrasta con la ausencia de efectos producidos por la expresión de isoformas de Nrns en neuronas, sugiriendo que NLS actúan como un factor limitante en la neurona postsináptica (Dean et al., 2003; Futai et al., 2007).

El empleo de mutantes de delección en cultivos ha indicado que β Nrxn1 regula la probabilidad de liberación mediante su dominio citoplásmico. Así, mientras que la sobreexpresión de β Nrxn1 en rodajas de hipocampo no tuvo efecto, la expresión del mutante β Nrxn1 Δ C redujo la probabilidad de liberación de glutamato en neuronas del hipocampo (Futai et al., 2007). El papel de β Nrxn1 regulando la función presináptica glutamatérgica es acorde con la localización de β Nrxn1 en terminales glutamatérgicos in vivo (Futai et al., 2013).

2.3 Código transináptico mediado por Nrns y NLS

Las diferentes isoformas de NLS presentan distinta localización sináptica. NL1 está presente en sinapsis excitatorias (Song et al., 1999), donde a través de su motivo de unión a dominios PDZ se une con la proteína de andamiaje postsináptico PSD-95 (Irie et al., 1997) e indirectamente con Shank (Naisbitt et al., 1999). Por su parte, NL2 se localiza en las sinapsis inhibitorias, donde se une a la proteína de andamiaje gefirina (Graf et al., 2004; Pouloupoulos et al., 2009; Varoqueaux et al., 2004). NL3, en cambio, se localiza tanto en sinapsis glutamatérgicas como GABAérgicas (Budreck et al., 2007). La localización diferencial de NL1 y NL2 se relaciona con su actividad funcional en sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas. Así, en cultivos de neuronas, mientras que NL1 induce la formación de sinapsis glutamatérgicas, NL2 estimula la formación de sinapsis GABAérgicas. Este efecto está regulado por splicing

alternativo. La inclusión del inserto B específico de NL1 favorece la formación de sinapsis glutamatérgicas, mientras que NL2 –que carece del sitio B– promueve su localización en contactos GABAérgicos (Chih et al., 2006). La introducción artificial del sitio B en NL2 incrementa la localización y densidad de contactos excitatorios. Además, estos efectos concuerdan con los observados *in vivo*, ya que el ratón knockout (KO) de Nlgn1 presenta defectos en la transmisión glutamatérgica, con un menor ratio NMDA/AMPA, mientras que el KO de Nlgn2 tiene un descenso en la respuesta sináptica inhibitoria (Chubykin et al., 2007).

La interacción entre isoformas de Nrnxns y NLs se regula por splicing alternativo en los dominios extracelulares. La presencia del inserto B en NL1 permite su unión con isoformas β Nrnxns AS4-, mientras que impide la interacción con β Nrnxns AS4+ o α Nrnxns (Boucard et al., 2005; Ichtchenko et al., 1995; Nguyen et al., 1997). Por otra parte, la ausencia del sitio B en NL2 facilita la interacción con isoformas de α o β Nrnxns independientemente de la presencia del sitio AS4 (Chih et al., 2006). De forma similar, la expresión de β Nrnxn1 AS4- en células no neuronales estimula el reclutamiento de marcadores postsinápticos glutamatérgicos (PSD95), mientras que la inclusión de AS4 en β Nrnxn1 inhibe el reclutamiento de PSD95, sin afectar el reclutamiento de Gefirina (Chih et al., 2006). Estos datos han sugerido la existencia de un código de adhesión transináptico entre isoformas de Nrnxns y NLs que regula la especificidad y el funcionamiento de los circuitos sinápticos (Figura 4).

		NL1 +B	NL1 -B,2,3	LRRTMs	Cbln1/ GluA δ 1,2
Nrnxns	β Nrnxn AS4-	Sí	Sí	Sí	No
	β Nrnxn AS4+	No	Sí	No	Sí
	α Nrnxn AS4-	No	Sí	Sí	No
	α Nrnxn AS4+	No	Sí	No	Sí

Tabla 1. Resumen de las interacciones observadas entre las isoformas de Nrnxns y sus ligandos.

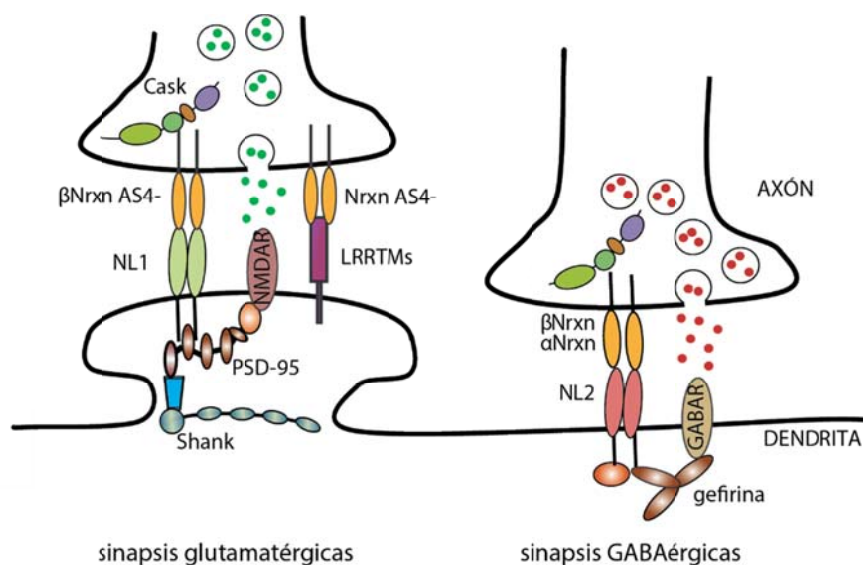


Figura 4. Las Nrns interactúan con distintos ligandos en diferentes tipos de sinapsis.

Durante los últimos años se han identificado rutas paralelas de organización de los terminales sinápticos por proteínas de adhesión. Entre ellas, los LRRTMs (*Leucine-rich-repeat transmembrane*) son proteínas transmembrana que se unen a Nrns carentes del inserto AS4 en sinapsis glutamatergicas (tabla 1) (figura 4) (de Wit et al., 2009; Ko, Fuccillo, Malenka, & Südhof, 2009). Por otra parte, las cerebelinas (Cblns) —glicoproteínas secretadas por las células ganglionares del cerebelo— hacen de puente de interacción entre Nrns AS4+ y el receptor GluA δ 2 (Uemura et al., 2010). También se ha demostrado que distroglicanos y latrofilinas se unen específicamente a isoformas Nrns AS4- (Boucard, Ko, & Südhof, 2012; Sugita et al., 2001) y que Neurexofilinas 1 y 3 y Calsitenina se unen exclusivamente a α Nrns (Born et al., 2014; Missler et al., 1998; Pettem et al., 2013). Recientemente se ha descrito un mecanismo adicional de modulación de las interacciones de Nrns, por el cual la proteína Hevin —secretada por los astrocitos—, hace de puente de conexión entre α Nrns y NL1 +B, que en otras condiciones no se ensamblarían (Singh et al., 2016). Por otra parte, existen diferentes moléculas presinápticas de adhesión que realizan contactos paralelos a los de Nrns, como los Glipicanos o Netrin-G2 (de Wit et al., 2013; Nishimura-Akiyoshi, Niimi, Nakashiba, & Itohara, 2007).

El elevado número de proteínas de adhesión transináptica identificadas sugiere la importancia de su función y la parcial redundancia de las interacciones que median en los circuitos neuronales.

2.4 Funciones de Nrns y NLS *in vivo*

La función sináptica del sistema de Nrns/NLS *in vivo* se ha explorado mediante la generación de distintos modelos animales deficientes en genes de la ruta. Se han reportado ratones *knockout* (KO) de α Nrxn1, KO de α Nrxn2, KO de α Nrxn3, triple KO (TKO) α Nrxn1-3, TKO β Nrxn1-3 y KO α/β Nrxn1-3 total (Anderson et al., 2015; Aoto, Martinelli, Malenka, Tabuchi, & Südhof, 2013a; Aoto, Földy, Ilcus, Tabuchi, & Südhof, 2015; Born et al., 2015; L. Y. Chen, Jiang, Zhang, Gokce, & Südhof, 2017; M. R. Etherton, Blaiss, Powell, & Südhof, 2009; Markus Missler et al., 2003). Así mismo, también se han generado ratones deficientes en genes de NLS, como el KO de *Nlgn1*, KO de *Nlgn2*, KO de *Nlgn3*, KO de *Nlgn4* y el TKO *Nlgn1-3* (Chubykin et al., 2007; Földy, Malenka, & Südhof, 2013; Stephane Jamain et al., 2008; Varoqueaux et al., 2006). En general, estos modelos han llevado a identificar efectos principalmente en la función de las sinapsis que difiere según la isoforma afectada, con un efecto menor en la densidad sináptica, sugiriendo la existencia de otros genes con función sinaptogénica. Los efectos observados en estos modelos destacan el papel fundamental de las Nrns en la transmisión sináptica. Así por ejemplo, el TKO α Nrxn1-3 presenta una reducción en la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria y una reducción en la densidad sináptica de sinapsis GABAérgicas pero no glutamatérgicas (Markus Missler et al., 2003). El TKO β Nrxn1-3 muestra una reducción en la transmisión sináptica exclusivamente glutamatérgica, sin cambios en la densidad sináptica (Anderson et al., 2015). Por otra parte, el KO de *Nlgn1-3* presenta una reducción en la transmisión sináptica inhibitoria y excitatoria sin afectar al número de sinapsis (Varoqueaux et al., 2006). A pesar de ello, existe un papel parcialmente redundante entre las distintas isoformas, cuyas funciones pueden verse compensadas por las isoformas no afectadas. Así mismo, estos estudios muestran que el papel de una misma isoforma de Nrns puede variar entre diferentes sinapsis y circuitos, indicando que la ausencia de isoformas de Nrns se puede enmascarar por la expresión de otras proteínas que dependen, a su vez, del circuito concreto.

Mediante el análisis cuantitativo de las isoformas de mRNA Nrns *in vivo* se han identificado 1.364 isoformas diferentes de α Nrns y 37 de β Nrns (Schreiner et al., 2014) generadas por *splicing* alternativo. Abordajes de proteómica han demostrado un nivel de expresión de α Nrns cuatro veces superior a β Nrns, aunque β Nrxn1 se expresa por todo el cerebro y

presenta mayor expresión en corteza e hipocampo. Las proteínas SAM68, Slm1 y Slm2 regulan el *splicing* de Nrns en el sitio AS4, que se unen al mRNA de Nrns y favorecen la excisión del inserto AS4 (Ehrmann et al., 2013; Iijima et al., 2011; Iijima, Iijima, Witte, & Scheiffele, 2014). La expresión de estas proteínas reguladoras de *splicing* está estrechamente controlada y permite una elevada especificidad en el uso de las distintas isoformas de Nrns según la región cerebral y tipo celular. Esto genera una mayor presencia de Nrnx1 AS4- en regiones del prosencéfalo, como corteza, hipocampo y estriado, mientras que los niveles de Nrns AS4+ son más elevados en el cerebelo (Ehrmann et al., 2013; Fuccillo et al., 2015; Nguyen et al., 2016; Schreiner et al., 2014; Schreiner et al., 2015). Más específicamente, las isoformas de Nrnx1 AS4- están enriquecidas en las neuronas piramidales de la corteza e hipocampo y las Nrnx1 AS4+ en las interneuronas PV (Nguyen et al., 2016). La regulación del *splicing* alternativo de Nrns determina la conectividad de las neuronas a nivel local y entre distintas regiones.

Basado en las demostraciones de la interacción de β Nrnx1 con NL1 en las sinapsis glutamatérgicas, así como en los datos de expresión de β Nrnx1 AS4- en diferentes regiones cerebrales y tipos celulares *in vivo*, estos datos apuntan a un papel preponderante de β Nrnx1 AS4- en neuronas de proyección del prosencéfalo, incluyendo corteza, estriado e hipocampo.

2.5 Papel de Nrns/NLs en la modulación del sistema endocannabinoide (eCB)

Recientemente se ha relacionado la ruta Nrns/NLs con la señalización mediada por el sistema neuromodulador eCB (Anderson et al., 2015; Földy et al., 2013; Speed, Masiulis, Gibson, & Powell, 2015). Los eCBs son moléculas lipofílicas de señalización principalmente retrógrada, que se sintetizan en el terminal postsináptico a demanda de la actividad sináptica y se unen a los receptores de eCBs (CB1R, CB2R), situados en el terminal presináptico. La activación de estos receptores da lugar a una inhibición de la actividad de la neurona presináptica mediante la señalización acoplada a proteínas G. Los dos compuestos eCBs mejor caracterizados son 2-araquidonil glicerol (2-AG) y N-araquidonil etanolamida (AEA) (Castillo et al., 2012).

Los modelos KO *Nlgn3* y el modelo *knockin* (KI) R451C *Nlgn3* —que reproduce una mutación encontrada en dos hermanos con autismo, véase más adelante— presentan una reducción en la señalización tónica de eCBs que causa un incremento de la transmisión sináptica de las interneuronas CCK sobre las neuronas piramidales del hipocampo (Földy et al., 2013). Por otra parte, los ratones TKO *βNrxn1-3* muestran un descenso en la transmisión sináptica glutamatérgica que se recupera mediante el empleo de bloqueantes de CB1R o con la inhibición de la síntesis de 2-AG (Anderson et al., 2015). De forma interesante, la pérdida de transmisión sináptica glutamatérgica se recupera específicamente con β Nrxn1 AS4- y no con otras isoformas (Anderson et al., 2015) Los autores postulan que las β Nrxns constituyen un freno para la producción tónica de eCBs y que la ausencia de β Nrxns provoca un incremento en la liberación de 2-AG (Anderson et al., 2015).

Estos u otros mecanismos podrían explicar la importancia de la correcta función de la ruta Nrxns/NLs en la función de los circuitos, así como su disfunción en enfermedades mentales, como el autismo.

3. Trastornos del espectro autista

3.1 Descripción clínica y epidemiológica del TEA

El autismo se describió por Leo Kanner (1943) y fue posteriormente ampliado por Hans Asperger (1944). Debido a la gran diversidad en la presentación clínica, los casos de autismo actualmente se clasifican en un abanico de trastornos relacionados con el autismo en el Trastorno del Espectro Autista (TEA o ASD, de sus siglas en inglés) (American Psychiatric Association [APA], 2013). El TEA comprende un grupo heterogéneo de patologías del neurodesarrollo que comparten dos síntomas que aparecen durante la infancia y perduran durante toda la vida:

- Patrones repetitivos y restringidos de conductas, actividades e intereses.
- Déficit persistentes en comunicación social e interacción social.

El TEA es la enfermedad del neurodesarrollo con mayor prevalencia. Los últimos datos recogidos muestran que afecta a uno de cada 68 niños de ocho años en Estados Unidos y se estima que afecta al 1-2% en la población adulta mundial (Christensen et al., 2016). Existen diferencias según el género, ya que el TEA es aproximadamente cuatro veces más frecuente en niños que en niñas (Christensen et al., 2016). Más del 70% de los casos presentan comorbilidad con otros problemas, como epilepsia, déficits en el lenguaje o incapacidad intelectual.

3.2 Hipótesis del origen del TEA

Como ocurre en otras enfermedades del neurodesarrollo, los síntomas del autismo aparecen en la infancia y perduran durante la etapa adulta (Figura 5). Aunque la mayoría de los casos se detectan alrededor de los 4 años (Christensen et al., 2016), el momento del desarrollo en el que se generan los defectos es desconocido. Existen dos posibilidades sobre el origen temporal de los defectos causantes del TEA:

- Un defecto restringido al desarrollo temprano con manifestaciones postnatales duraderas. Según esta posibilidad, los defectos se generarían durante un periodo crítico del desarrollo, posiblemente por un acortamiento del periodo de mayor neuroplasticidad cerebral (Berger et al., 2013). Esta posibilidad sugiere que la reversión de los síntomas del autismo en etapas más tardías sería complicada o imposible.
- Alternativamente, una disfunción postnatal continua de los circuitos neuronales podría desencadenar la aparición de los síntomas, que se manifestarían mientras la disfunción perdurara. Esta opción amplía la ventana terapéutica de actuación, ya que la recuperación de la disfunción crónica causante de la patología podría llevar a la mejora de los síntomas incluso en la vida adulta.



Figura 5. Diagrama de la temporalidad en la aparición de los síntomas en TEA. Los síntomas aparecen durante la infancia y perduran durante toda la vida.

3.3 Base genética del TEA

Hasta hace pocas décadas, la etiología del TEA era completamente desconocida. En 1977 se comenzó a descubrir la importancia de la contribución genética en la patología (Folstein et al., 1977) y los primeros estudios de concordancia en gemelos monozigóticos estimaron una heredabilidad del 90% (Bailey et al., 1995; Steffenburg et al., 1989). Durante la última década, el desarrollo de las técnicas genómicas ha iniciado la identificación de las bases genéticas del autismo. Los tipos de mutaciones identificadas incluyen variantes del número de copias o CNVs (del inglés *Copy Number Variants*), pequeñas inserciones o deleciones y variantes de nucleótidos individuales o SNVs (del inglés *Single Nucleotide Variants*). Dentro del TEA se han descrito algunos trastornos monogénicos, pero ninguno explica más del 1-2% de los casos y juntos sólo suponen el 5-10% del total de casos (Sztainberg et al., 2016).

El TEA se clasifica en sindrómico y no sindrómico, distinción que se realiza según criterios clínicos. El término sindrómico se refiere a los casos en los que el autismo se da en presencia de fenotipos adicionales o características dismórficas. En la mayoría de casos sindrómicos la etiología es conocida y puede deberse a anomalías cromosómicas, *de novo* CNVs o mutaciones en genes concretos, como ocurre en el síndrome de X frágil y el gen *FMR1*, el síndrome de Rett y *MECP2* y la esclerosis tuberosa y *TSC1-2*. La clasificación no sindrómico, antiguamente denominado “autismo clásico”, representa la mayoría de casos de autismo y engloba los pacientes que no presentan síntomas adicionales (Sztainberg et al., 2016). La naturaleza poligénica del autismo no sindrómico complica la identificación de los genes responsables, ya que en la mayoría de los casos la presentación clínica se debe a la contribución de un número relativamente extenso de mutaciones que, individualmente, tienen un efecto limitado. Sin embargo, las aproximaciones de genética humana han permitido descubrir rutas concretas asociadas con autismo.

3.4 Convergencia en rutas de genes asociados al TEA

Recientes estudios genéticos basados en colecciones de miles de pacientes con autismo no sindrómico han identificado genes de riesgo que forman una red enriquecida en proteínas sinápticas, reguladoras de la cromatina y de la transcripción y de degradación de proteínas, entre otras (Casanova et al., 2016; De Rubeis et al., 2014; Iossifov et al., 2014; Pinto et al., 2014; Sanders et al., 2015; Yuen et al., 2017). SFARI —de la Fundación Simons— y Autism Kb —de la Universidad de Pekín— son dos grandes bases de datos que agrupan los estudios publicados sobre la genética del autismo (<https://sfari.org>, <http://autismkb.cbi.pku.edu.cn/index.php>). Estas plataformas corroboran la participación de mutaciones en proteínas sinápticas como factores de riesgo de TEA, en las que las familias génicas de *Nrxns* y *NLs* están puntuadas como de alta asociación con autismo.

La convergencia de mutaciones en rutas específicas resulta esperanzadora para el tratamiento de un conjunto de enfermedades tan heterogéneo (Lin et al., 2016). Por este motivo, el foco en el campo del autismo se ha centrado en el estudio de las rutas de señalización comunes a varios genes de riesgo, que podrían verse afectadas en un conjunto más amplio de pacientes.

3.5 Alteraciones genéticas en la ruta de *Nrxns* asociadas con TEA

Numerosos estudios genéticos en pacientes con TEA han encontrado alteraciones genéticas en el gen de *NRXN1*. La primera identificación fue la delección en heterocigosis de varios exones de *NRXN1* en dos hermanas afectadas con TEA (Szatmari et al., 2007). Desde entonces, repetidamente se han identificado CNVs, deleciones y mutaciones puntuales, más frecuentemente en el gen de *NRXN1* (Camacho-García et al., 2013, 2012; Ching et al., 2010; Dabell et al., 2013; Gauthier et al., 2011; Wiśniowiecka-Kowalnik et al., 2010). El número de pacientes con CNVs en *NRXN1* ha permitido realizar estudios de correlación genotipo-fenotipo. De forma interesante, estos estudios demuestran que las deleciones de *NRXN1* que afectan su parte más C-terminal, es decir, que también afectan a *βNRXN1*, tienen un mayor impacto en la presentación de los síntomas (Schaaf et al., 2012).

De manera interesante, también se han identificado mutaciones en otros genes de la ruta sináptica de Nrns, como la transición R451C en *NLGN3* o la inserción 1186insT y la delección de dos pares de bases en Xp22.33 descritas en *NLGN4* (Jamain et al., 2003; Laumonier et al., 2004). Como hemos explicado anteriormente, las NLs se unen indirectamente con la proteína de andamiaje Shank en las sinapsis glutamatérgicas. En este sentido, se han identificado alteraciones genéticas en los genes *SHANK1-3* en pacientes con TEA, siendo la mayoría deleciones cromosómicas asociadas al gen *SHANK3* en el síndrome Phelan-McDermid (Phelan et al., 2001, 2008; Wilson et al., 2003). Las fuertes evidencias genéticas de la alteración de la ruta Nrns/NLs/Shanks en pacientes con TEA destacan el papel de la disfunción de las sinapsis glutamatérgicas en la fisiopatología del autismo.

3.6 Regiones y rutas cerebrales implicadas en TEA

Estudios de imagen por resonancia magnética en pacientes con TEA muestran alteraciones en la conectividad cerebral. Se han reportado deficiencias en la conectividad de la corteza prefrontal, la amígdala y áreas corticales sensorimotoras (Gotts et al., 2012) e incrementos en la conectividad funcional local en subregiones estriatales y el sistema límbico (Di Martino et al., 2011). Así mismo, se ha observado un incremento de la conectividad local dentro de la misma región cerebral y un descenso de la interconectividad a largo rango (O'Reilly et al., 2017; Wass, 2011).

Diversos estudios anatómicos apuntan a una disfunción de circuitos cortico-estriatales como nodo común de TEA (Fuccillo, 2016; Hutsler & Casanova, 2016; G. M. G. Shepherd, 2013). Entre ellos, se ha descrito defectos en la organización de las columnas corticales (Casanova et al., 2010) y una mayor densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales corticales correlacionada con la gravedad de la sintomatología (Hutsler et al., 2010). En la misma línea, se ha observado un incremento en el volumen y crecimiento del estriado asociado a una mayor presentación de comportamiento repetitivo (Langen et al., 2014). Los datos genéticos apoyan estos resultados, ya que se ha observado un mayor impacto en las mutaciones que afectan a neuronas de la corteza y a las neuronas principales del estriado o MSNs (del inglés *Medium Spiny Neurons*), implicando circuitos corticales y cortico-estriatales en la fisiopatología del TEA (Chang et al., 2015; Parikshak et al., 2013).

Las conexiones cortico-estriatales constituyen la mayor parte de las aferencias al estriado (Guo et al., 2015). El estriado se divide en estriado dorsal —que incluye los núcleos caudado y putamen (CPu)— y ventral —que comprende principalmente el núcleo accumbens (NAc)—. Ambas regiones se diferencian según sus conexiones. El estriado dorsal recibe conexiones provenientes principalmente de la corteza cingulada, somatosensorial y motora, mientras que al estriado ventral llegan proyecciones de la corteza prefrontal y el sistema límbico (Fuccillo, 2016; Guo et al., 2015; Macpherson et al., 2014). Las proyecciones del estriado se dividen en la vía directa e indirecta y están mediadas por las MSNs que expresan el receptor de dopamina D1 o D2, respectivamente (figura 6). La vía directa, tras conectar con la sustancia negra reticulada y globo pálido interno, proyecta al tálamo y produce una mayor activación de la vía talamo-cortical. En cambio, la vía indirecta proyecta al globo pálido externo y núcleo subtalámico antes de inervar el globo pálido interno y la sustancia reticular, y su activación produce una inhibición de la vía talamo-cortical (Shipp, 2017). La convergencia en el estriado de diferentes estímulos permite controlar dinámicamente y adaptativamente el flujo de información cognitiva y afectiva hacia sistemas motores (Macpherson et al., 2014).

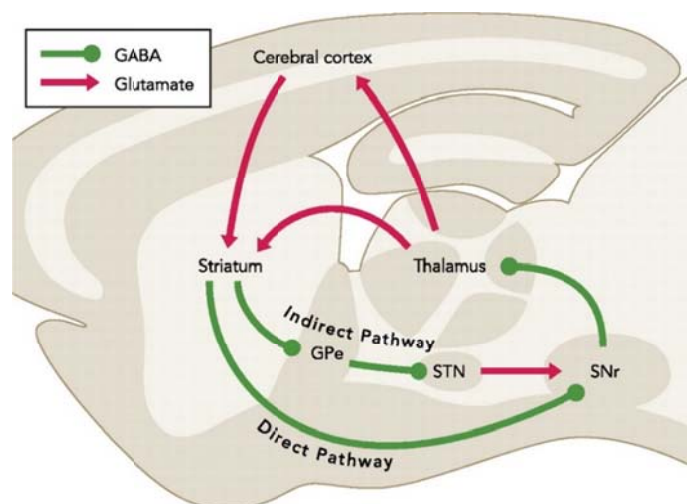


Figura 6. Esquema sagital de los principales circuitos del estriado. Se muestran las conexiones glutamatergicas (rojo) y GABAérgicas (verde) de las proyecciones de las vías directa e indirecta. GPe, globo pálido externo; STN, núcleo subtalámico; SNr, sustancia negra reticulada (figura extraída de (Kravitz et al., 2012)).

3.7 Desbalance E/I como elemento común en TEA

Como hemos dicho anteriormente, el correcto balance E/I regula la actividad de los circuitos cerebrales. Estudios en pacientes con TEA han detectado un incremento de excitación en el balance E/I que podría explicar la alta comorbilidad del autismo con la epilepsia (Rubenstein et al., 2003). Sin embargo, otros estudios muestran resultados en sentido opuesto, por lo que se ha sugerido que el desbalance E/I subyacente al TEA se podría deber a defectos en la adaptación homeostática frente a cambios de actividad de los circuitos (Nelson et al., 2015).

La transmisión inhibitoria coordina la actividad de las redes neuronales (Kandel et al., 2013). Estudios clínicos muestran una reducción de GABA en la corteza somatosensorial de pacientes con TEA que provoca anomalías en el procesamiento sensorial (Puts et al., 2014, 2017). Las neuronas GABAérgicas más abundantes de la corteza expresan parvalbúmina (PV) y pertenecen al grupo de las interneuronas *fast-spiking*. Las neuronas PV forman una red de sinapsis GABAérgicas y uniones tipo *gap* que genera una actividad rítmica en el rango de frecuencia *gamma* que sincroniza la actividad de las neuronas principales (Bartos et al., 2007; Sohal et al., 2009). Diferentes estudios clínicos describen descensos e incrementos patológicos de las oscilaciones *gamma* en la corteza de pacientes con TEA (Maxwell et al., 2015; Orekhova et al., 2007; Wilson et al., 2007).

4. Utilización de animales de experimentación para modelar el TEA

El elevado componente genético del autismo ha impulsado la generación de animales genéticamente modificados como modelos de la patología. Sin embargo, la heterogeneidad clínica y molecular del TEA unido a sus características clínicas hacen complicado su estudio. Por ello se han establecido parámetros de calidad para la generación y validación de modelos animales de autismo (Crawley, 2007). Idealmente, un modelo animal de autismo debe cumplir tres criterios:

- *Construct validity*: reproducir la mutación causal del autismo encontrada en pacientes.
- *Face validity*: el fenotipo debe ser análogo a la presentación clínica del TEA.
- *Predictive validity*: presentar la respuesta esperada a tratamientos que son efectivos en la clínica. Debido a la falta de tratamientos efectivos para el TEA, este último criterio es poco informativo.

4.1 Modelos animales de autismo

La mayoría de modelos animales de autismo consisten en ratones KO. Estos animales, a pesar de no reproducir una mutación concreta identificada en pacientes, comprometen la función de genes afectados en la clínica. Es el caso de los modelos de autismo sindrómico, como los ratones KO *Fmr1* —como modelo del síndrome de X frágil—, KO *MeCP* —como modelo del síndrome de Rett— o KO *Tsc1* o *Tsc2* de la ruta mTOR (*mechanistic Target Of Rapamycin*) —como modelo del síndrome de esclerosis tuberosa— (Sztainberg et al., 2016). Por otra parte, se han generado modelos de autismo no sindrómico mediante mutaciones o escisiones de genes sinápticos. Entre ellos se encuentran los que tienen afectados miembros de la ruta *Nrxns/NLs/Shank* como el ratón KI R451C *Nlgn3* (Jamain et al., 2003; Tabuchi et al., 2007) y los KO α *Nrxn1*, KO α *Nrxn2*, KO *Nlgn1*, KO *Nlgn3*, KO *Nlgn4* y KO *Shank1*, KO *Shank2* y KO *Shank3* (Blundell et al., 2010; Born et al., 2015; Bozdagi et al., 2010; Dachtler et al., 2014; M. Etherton et al., 2011; M. R. Etherton et al., 2009; Jamain et al., 2008; Jaramillo et al., 2017; Jaramillo et al., 2014; Peça et al., 2011; Rothwell et al., 2014; Schmeisser et al., 2012; Wang et al., 2011, 2016; Wöhr et al., 2011; Won et al., 2012).

La mayoría de los modelos de autismo generados afectan a todas las regiones cerebrales en todos los momentos del desarrollo. Por ello, no permiten discriminar si los efectos derivados son la causa o la consecuencia de la alteración de un circuito, ni entre problemas causados durante el desarrollo prenatal y defectos continuados en etapas posteriores (Hulbert et al., 2017; Nelson et al., 2015).

4.2 Evaluación del comportamiento asociado a TEA en ratones

Como hemos descrito anteriormente, los criterios diagnósticos del TEA se basan en las características del comportamiento que presentan los pacientes, agrupados en dos síntomas principales (APA, 2013):

- Patrones repetitivos y restringidos de conductas, actividades e intereses
- Déficits persistentes en interacción social y comunicación social

Para validar el criterio de *face validity* en los modelos animales de autismo es fundamental poder evaluar comportamientos análogos a estos síntomas. En este punto vamos a explicar los paradigmas más aceptados entre la comunidad científica para analizar en roedores comportamientos asociados a los síntomas del TEA (Crawley, 2007, 2012; Pasciuto et al., 2015).

4.2.1 Análisis de patrones repetitivos de conductas y actividades

En pacientes, las conductas repetitivas y restrictivas se manifiestan con un comportamiento motor repetitivo sin motivo aparente y una fuerte adherencia a rutinas y hábitos estereotipados. La frecuencia de aparición y duración de los comportamientos repetitivos se utiliza para puntuar la severidad del TEA en la clínica (APA, 2013).

Las pruebas para evaluar el comportamiento repetitivo en modelos de ratón se basan en la observación de repeticiones en comportamientos espontáneos. Uno de los paradigmas más utilizados es el test de *self-grooming*, que analiza los eventos de acicalamiento espontáneo que presenta el ratón (Figura 7).

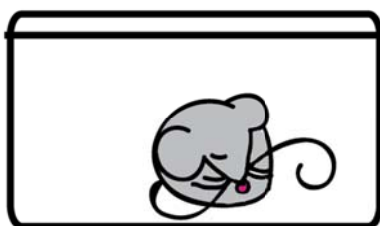


Figura 7. Esquema gráfico del comportamiento de acicalamiento repetitivo.

4.2.2 Evaluación de los déficits en interacción social

Los roedores son animales altamente sociables. Uno de los test más sensibles y más utilizados para estudiar la interacción social en ratones es el test de sociabilidad *3-chamber*, que permite cuantificar la aproximación social iniciada por el ratón a evaluar. En esta prueba se necesitan tres habitaciones conectadas —una central y dos laterales— a través de las cuales el ratón puede moverse libremente. En las habitaciones laterales se coloca un cilindro enrejado que contiene un estímulo social —un ratón desconocido del mismo sexo y edad— o uno no social —un objeto de dimensiones similares a un ratón— (Figura 8). Un mayor tiempo de interacción con el ratón que con el objeto refleja la preferencia por la interacción social.

En una segunda fase de la prueba el objeto se reemplaza por un ratón nuevo (Figura 8). De esta forma se puede cuantificar la preferencia por la novedad social, entendida como un mayor tiempo de interacción con el ratón recientemente introducido (nuevo) frente al ratón común con la fase anterior (familiar).

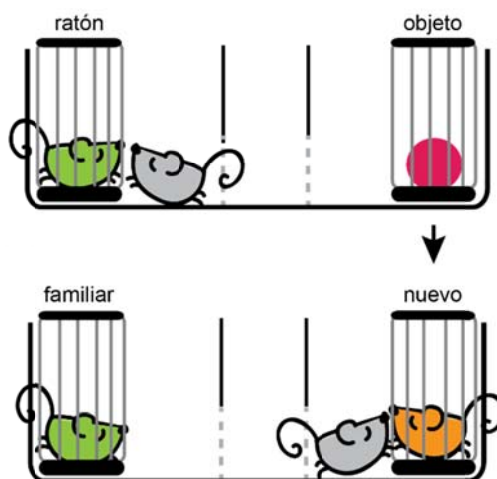


Figura 8. Esquema gráfico de la prueba de sociabilidad *3-chamber*. La fase de preferencia social se muestra en la parte superior y la fase de preferencia por la novedad social en la inferior.

4.2.3 Evaluación de los defectos en la comunicación social

Una parte muy importante de la comunicación entre los roedores se basa en el olfato, que es el sentido que tienen más desarrollado. Esto les permite diferenciar y sentirse atraído por

los nuevos olores y discriminar entre olores sociales y no sociales. Para evaluar la comunicación social guiada por la olfacción se ha establecido el test de habituación/deshabituación a la olfacción (Yang et al., 2009).

En esta prueba los ratones se exponen repetida y secuencialmente a olores no sociales y sociales, cuantificándose el tiempo que invierten oliendo cada uno de ellos (Figura 9). La comunicación social se asocia al incremento en interacción con los olores sociales con respecto a los no sociales.

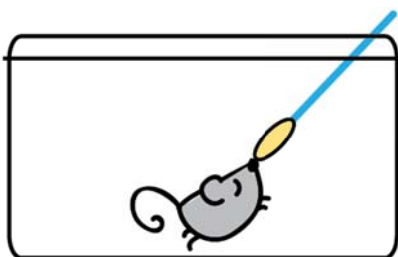


Figura 9. Esquema gráfico de la prueba de habituación/deshabituación de la olfacción.

II. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

1. Mutaciones específicas de β Nrxn1 en pacientes con autismo

Como ya hemos explicado en la Introducción, existen numerosos estudios genéticos que ponen en manifiesto la contribución de la ruta de Nrxns/NLs/Shanks en el autismo. Repetidamente se han descrito delecciones en el gen *NRXN1* en pacientes con ASD que afectan a isoformas α *NRXN1* y algunas que afectan a las regiones compartidas con β *NRXN1*. En los últimos años se han descrito además mutaciones específicas de las isoformas β *NRXN1* que afectan al codón de inicio de la traducción (Camacho-Garcia et al., 2012, 2013) (Figura 10). Las mutaciones de β *NRXN1* que afectan al inicio de la traducción provocan el uso de un codón de inicio alternativo situado en Met+5, que conlleva una reducción en los niveles sinápticos de la proteína β Nrxn1 en cultivos neuronales (Camacho-Garcia et al., 2013, 2012). Por ello, se ha sugerido que la hipofunción de β Nrxn1 en la sinapsis podría jugar un papel importante en la etiología del ASD.



Figura 10. Esquema que muestra la agrupación de las mutaciones puntuales encontradas en pacientes con ASD en el promotor y el codón de inicio del gen β *NRXN1* (Camacho-Garcia et al., 2013, 2012). SP- péptido señal.

2. Generación de un ratón mutante para modelar la disfunción de β Nrxn1

Con el objetivo de modelar la disfunción causada por mutaciones en β *NRXN1* nuestro laboratorio decidió utilizar una aproximación de dominante negativo. En el caso de Nrxns, el uso de un dominante negativo presenta ventajas interesantes respecto al empleo de ratones

KO. Por una parte, los pacientes con ASD presentan una alta heterogeneidad genética, casi privada, con tipos diversos de mutaciones y regiones afectadas, lo que dificulta la selección de una mutación concreta. Como hemos visto, la presencia de deleciones y de mutaciones puntuales puede resultar en una hipofunción de β Nrxn1. Por ello, un dominante negativo que modele esta disfunción representa una oportunidad de estudiar la patología de un conjunto de mutaciones descritas en pacientes. Por otro lado, el elevado número de isoformas diferentes de Nrxns (Schreiner et al., 2014) hace muy complicado el estudio de la hipofunción de isoformas concretas. Los ratones KO de Nrxns eliminan la expresión de todas las isoformas de los genes delecionados, por lo que no permiten analizar la contribución individual de una isoforma concreta. Debido a que diferentes isoformas de *splicing* se expresan en distinto tipo neuronal (Fuccillo et al., 2015; Nguyen et al., 2016) y pueden desempeñar funciones alternativas en distinto circuito cerebral (L. Y. Chen et al., 2017), decidimos estudiar la disfunción de una isoforma concreta de β Nrxn1, la isoforma β Nrxn1 AS4-. De entre las isoformas de Nrxn1, β Nrxn1 AS4- es la única se une con alta afinidad a NL1 y presenta además unión con LRRTMs (Boucard et al., 2005; Chih et al., 2006; Comoletti et al., 2006; Ko et al., 2009; Koehnke et al., 2010).

Con el objetivo de generar un mutante dominante negativo de β Nrxn1 AS4-, nuestro laboratorio diseñó una proteína mutante truncada en el dominio intracelular que mantiene los dominios extracelular y transmembrana de β Nrxn1 AS4-. Se bautizó con el nombre de β Nrxn1 Delta-Citoplásmico (β Nrx1 Δ C). Con esta estrategia se buscaba mantener la interacción con ligandos transinápticos a través del dominio extracelular, impidiendo al mismo tiempo la transducción de señales en el terminal presináptico por carecer del dominio intracelular (Figura 11). La proteína se marcó con la etiqueta HA en el extremo N-terminal para poder ser detectado con anticuerpos anti-HA (HA- β Nrx1 Δ C).

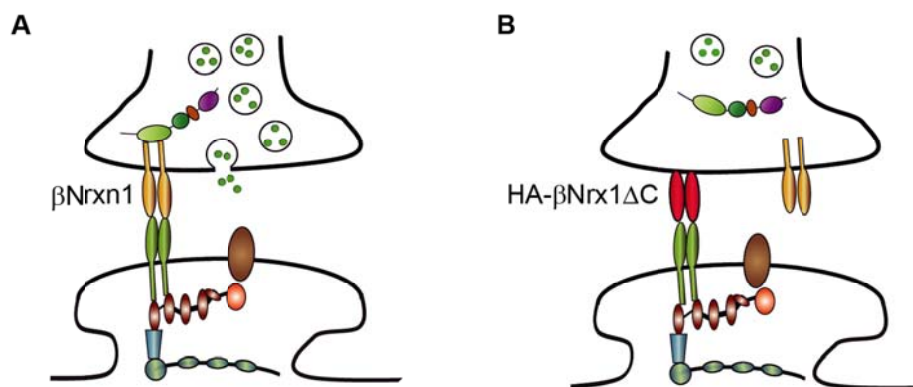


Figura 11. Representación esquemática de la predicción de la disposición del mutante HA-βNrx1ΔC en la sinapsis. A.- Esquema de la sinapsis en ausencia del mutante. B.- Esquema de la sinapsis incluyendo la proteína mutante HA-βNrx1ΔC.

3. Caracterización y efectos del mutante HA-βNrx1ΔC *in vitro*

Como primer paso de la caracterización del mutante HA-βNrx1ΔC se analizó la expresión y los efectos *in vitro*. Estos experimentos se realizaron en su mayoría por el Dr. Luis García Rabaneda (LGR).

Las Nrns se insertan en la membrana del terminal presináptico (Dean et al., 2003) y se ha descrito la necesidad del dominio citoplásmico para su localización en membrana (Fairless et al., 2008). Para analizar si el mutante HA-βNrx1ΔC alcanza la membrana celular, realizamos experimentos de inmunofluorescencia y de marcaje con biotina. Para ello, transfectamos con GFP y HA-βNrxn1 AS4- (HA-βNrxn1) o HA-βNrx1ΔC células de la línea HEK293T, que carece de expresión de Nrns endógenas que pudieran corregir la localización de mutantes exógenos de Nrns. Debido a que la etiqueta HA se localiza en el extremo N-terminal en ambas construcciones, la presencia en la superficie celular se puede detectar en experimentos de inmunofluorescencia de células sin permeabilizar. Mediante la tinción con el anticuerpo anti-HA detectamos la proteína HA-βNrx1ΔC en la superficie de células sin permeabilizar en igual medida que detectamos la proteína no truncada HA-βNrxn1 (figura 12). Por lo tanto y en contra de lo esperado (Fairless et al., 2008), la ausencia del dominio citoplásmico no impide la localización en membrana de βNrxn1.

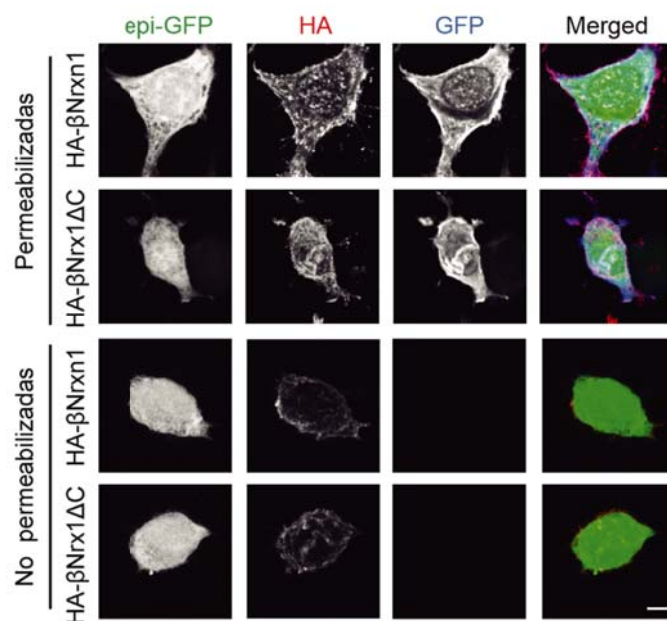


Figura 12. Detección de proteína HA- β Nrx1 Δ C en la superficie de células HEK293T sin permeabilizar mediante inmunofluorescencia. Células co-transfectadas con GFP y HA- β Nrxn1 o HA- β Nrx1 Δ C fueron analizadas permeabilizadas o sin permeabilizar con anticuerpos anti-HA (rojo). Nótese la presencia de HA- β Nrxn1 y HA- β Nrx1 Δ C en la membrana de células sin permeabilizar. La incubación con anti-GFP (azul) se utilizó como control de la no permeabilización en los paneles inferiores y la fluorescencia directa de GFP como control de transfección (verde). Escala de de tamaño: 5 μ m. Experimento realizado por LGR.

Estos resultados se confirmaron en cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Tras infectar los cultivos con partículas lentivirales que codifican GFP, HA- β Nrx1 o HA- β Nrx1 Δ C se realizó un marcaje de biotina superficial para purificar mediante afinidad a estreptavidina las proteínas presentes en la superficie. Como podemos ver en la figura 13, el mutante HA- β Nrx1 Δ C estaba presente en la fracción enriquecida en proteínas de membrana, de manera similar a la proteína HA- β Nrx1. La predicción del peso molecular de β Nrxn1 endógena es de 42,14kDa. Sin embargo, trabajos previos han demostrado que el dominio extracelular de las Nrns sufre procesos de glicosilación que incrementan el peso molecular de la proteína madura en membrana (Ushkaryov et al., 1994). Debido a que el dominio extracelular del mutante HA- β Nrx1 Δ C no está afectado, esperábamos que la proteína madura sufriera el mismo proceso de glicosilación si el transporte a membrana no se viera afectado. En el experimento realizado observamos tres bandas de HA- β Nrxn1 en la fracción de membrana,

con pesos moleculares aproximados de 54, 65 y 110kDa. El fragmento C-terminal del que carece el mutante HA-βNrx1ΔC tiene un peso molecular de 6kDa. Por ello, la banda detectada a unos 48kDa en el mutante indicó que el cambio de peso molecular con respecto a la banda inferior de HA-βNrxn1 sólo se debe a la diferencia en el número de aminoácidos, por lo que corresponde a formas maduras de la proteína. Este experimento confirma en neuronas la expresión en membrana de formas maduras del mutante HA-βNrxn1 que habíamos observado en el sistema heterólogo.

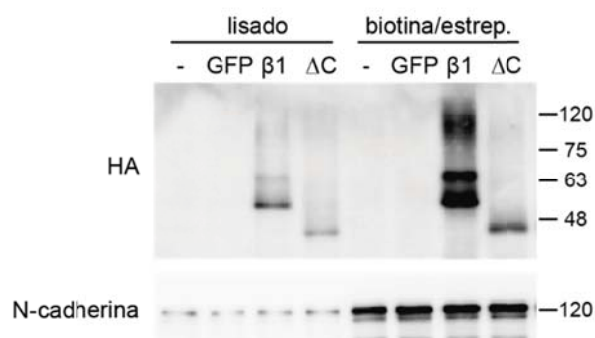


Figura 13. Experimento de marcaje de proteínas de superficie celular con biotina en neuronas infectadas con GFP, HA-βNrxn1 (β1) o HA-βNrx1ΔC (ΔC). Los lisados y las proteínas purificadas por la afinidad biotina/estreptavidina se analizaron por western blot con los anticuerpos anti-HA y anti-N-cadherina, como control del enriquecimiento en proteínas de membrana. A la derecha se indica el peso molecular de referencia. Experimento realizado por Estefanía Robles Lanuza.

Una vez confirmado que la ausencia del dominio citoplásmico no afecta a la localización de la proteína en membrana, se analizó la capacidad de HA-βNrx1ΔC para mediar uniones con ligandos postsinápticos. Esta pregunta se abordó en experimentos de co-cultivo de neuronas con células HEK293T no neuronales transfectadas con ligandos postsinápticos (Scheiffele et al., 2000). Entre los distintos ligandos de βNrxns, se ensayó la capacidad de VSV-NL1 para reclutar a HA-βNrxn1 y HA-βNrx1ΔC expresados en neuronas de hipocampo por infección lentiviral. Como se puede observar en la figura 14, la expresión de NL1 recluta con muy alta eficiencia la proteína HA-βNrx1ΔC a contactos glutamatérgicos —identificados con el anticuerpo anti-VGluT1— de manera similar a HA-βNrxn1. Por otra parte, el reclutamiento de VGluT1 no se vio afectado por la expresión de HA-βNrx1ΔC (Figura 14), sugiriendo que el

reclutamiento de vesículas sinápticas se realiza por un mecanismo no mediado por el dominio citoplásmico de β Nrxn1.

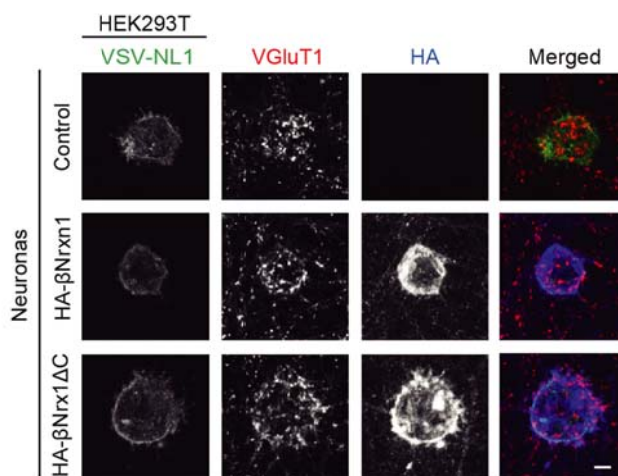


Figura 14. Reclutamiento de HA- β Nrxn1 y HA- β Nrx1 Δ C a células HEK que expresan VSV-NL1. Cultivos primarios de hipocampo infectados con partículas lentivirales que expresan HA- β Nrxn1 o HA- β Nrx1 Δ C y HEK293T transfectadas con con VSV-NL1 se co-cultivaron y tiñeron con los anticuerpos anti-VSV (verde), anti-vGluT1 (rojo) y anti-HA (azul). Escala de tamaño: 5 μ m. Experimento realizado por LGR.

Una vez se hubo verificado la llegada de la proteína mutante a la membrana y su capacidad de formar uniones transinápticas, se analizó su posible efecto como dominante negativo sobre la función sináptica. Para ello, se evaluó la liberación vesicular de neurotransmisores en neuronas control y en neuronas que expresan HA- β Nrxn1 o HA- β Nrx1 Δ C. Para analizar la liberación vesicular se expresó por transfección la sonda SypHy. Esta molécula contiene una molécula de GFP con fluorescencia eclíptica posicionada en el interior de la vesícula sináptica, gracias a la cual los eventos de liberación vesicular se detectan como incrementos en la fluorescencia de GFP. Se registró la fluorescencia emitida en respuesta a estímulos eléctricos con 40, 100 y 300 potenciales de acción (AP). Como se puede observar en la figura 15, la expresión de HA- β Nrxn1 no afectó al incremento de fluorescencia tras los trenes de estimulación, comparado con sinapsis control de cultivos no infectados. Sin embargo, cuando las neuronas expresaban el mutante HA- β Nrx1 Δ C la liberación vesicular sufrió una reducción del 30% (Figura 15). Por lo tanto, la ausencia de la cola citoplásmica de β Nrxn1 efectivamente provoca inhibición de la liberación vesicular en el terminal presináptico.

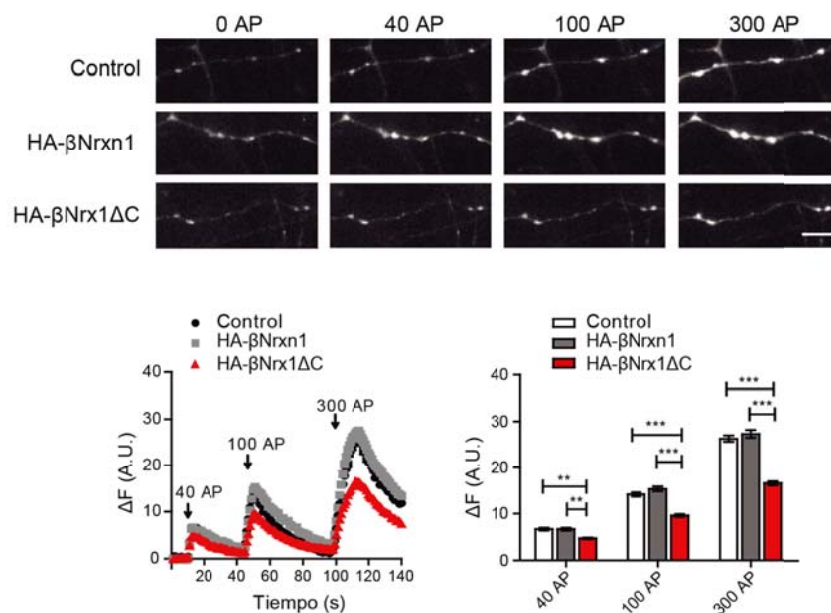


Figura 15. Descenso de la liberación vesicular sináptica en neuronas que expresan HA-βNrx1ΔC. En la parte superior se muestran fotogramas de neuronas control o transfectadas con HA-βNrxn1 o HA-βNrx1ΔC y transfectadas con la sonda Syphy, durante la estimulación con 40, 100 y 300 potenciales de acción (AP). Las gráficas representan la cuantificación de los incrementos de fluorescencia (ΔF) de las sinapsis durante los trenes de estimulación. Experimento realizado por LGR.

El conjunto de los datos *in vitro* demuestra que la carencia del dominio citoplásmico en el mutante HA-βNrx1ΔC no afecta a la localización en membrana ni a la unión con ligandos postsinápticos, mientras que afecta a la función presináptica reduciendo la liberación vesicular. Estos resultados prueban la validez de la construcción HA-Nrx1ΔC como dominante negativo para provocar defectos sinápticos en la ruta de señalización mediada por βNrxns *in vitro*.

4. Generación de un ratón transgénico del mutante HA-βNrx1ΔC

Con el objetivo de generar la disfunción de βNrxn1 *in vivo*, nuestro laboratorio decidió generar un ratón transgénico que expresara la construcción HA-βNrx1ΔC con un patrón espacio-temporal concreto. Dentro del patrón espacial, el objetivo fue expresar el dominante negativo en regiones con elevada expresión de isoformas carentes del inserto de

splicing AS4, como son las regiones del prosencéfalo (Ehrmann et al., 2013). Además, dentro del prosencéfalo, la corteza y el estriado destacan entre las regiones afectadas en pacientes con TEA.

Respecto al patrón temporal, las Nrns endógenas se expresan en el cerebro en desarrollo y maduro (Ehrmann et al., 2013; Iijima et al., 2011). Esta expresión temporal tan amplia nos sugirió dos posibilidades para evaluar el impacto de la disfunción de β Nrxn1 en la etiología del autismo. Una opción posible es que un defecto en la función de β Nrxn1 previo a la aparición de los síntomas genere cambios neuronales duraderos que no sean patentes hasta la infancia. Otra alternativa es que los síntomas se desencadenaran como consecuencia de una disfunción continua y crónica de β Nrxn1 presente durante toda la vida del paciente. Debido a que la expresión de Nrns se extiende más allá de la etapa de formación de los circuitos, decidimos evaluar el impacto crónico de la disfunción de β Nrxn1 en circuitos postnatales.

Para dirigir la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C de manera controlada en el tiempo y el espacio nuestro grupo seleccionó el promotor de la proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina tipo II (CaMKII), activo a nivel postnatal y en las neuronas principales del prosencéfalo —como corteza y estriado—. Se utilizó dentro del método inducible Tet-off, que permite inhibir la expresión del gen exógeno para poder estudiar la posible reversión del fenotipo. El Tet-off es un sistema transgénico binario en el cual la expresión del transgén de interés depende de la actividad de un activador transcripcional inducible (Furth et al., 1994; Gossen & Bujard, 1992). Las características principales de las dos líneas de ratones simples transgénicos que se utilizaron para generar el ratón doble transgénico β Nrx1 Δ C se resumen a continuación:

- CaMKII-tTA: Es el transactivador controlado por tetraciclina (tTA) bajo el promotor de CaMKII. Esta línea de ratón transgénico fue generada por Mayford et al (1996).
- TRE-HA- β Nrx1 Δ C: Es el mutante HA- β Nrx1 Δ C generado en nuestro laboratorio bajo el control de un promotor con el elemento de respuesta a tetraciclina (TRE).

Según el diseño de esta aproximación, el promotor CaMKII es activo a nivel postnatal y dirige la expresión del transactivador tTA a las neuronas principales del prosencéfalo. En

condiciones basales, el factor de transcripción tTA se une al promotor TRE y activa la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C. En cambio, en presencia de Tetraciclina o análogos como la doxiciclina (Dox), se bloquea esta unión y tTA no puede activar al promotor TRE, por lo que la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C se inactiva (Figura 16).

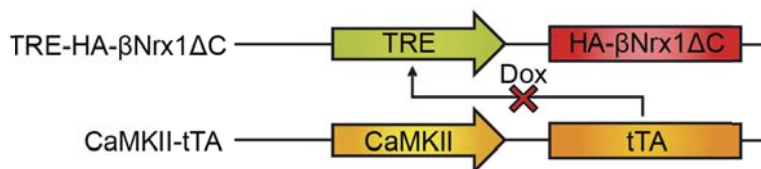


Figura 16. Esquema del sistema Tet-off empleado para generar la línea de ratón doble transgénico β Nrx1 Δ C. En rojo se indica la secuencia codificante del mutante de β Nrxn, el cual se expresa cuando el promotor TRE se activa por el transactivador tTA en las neuronas postnatales del prosencéfalo con actividad del promotor CaMKII. La presencia de Dox impide esta activación.

En resumen, para modelar la disfunción de β Nrxns provocada por diversas mutaciones encontradas en pacientes con autismo en nuestro laboratorio se generó el mutante HA- β Nrx1 Δ C. Esta proteína trunca puede interaccionar con ligandos postsinápticos pero actúa como un dominante negativo, ya que reduce la liberación vesicular de neuronas en cultivo. Utilizando este mutante como herramienta molecular generamos la línea de ratón transgénico β Nrx1 Δ C mediante el sistema inducible Tet-off, para dirigir la expresión postnatal e inducible del mutante a neuronas principales del prosencéfalo y de esta forma provocar la disfunción crónica de β Nrxns en estos circuitos.

III. OBJETIVOS

Los objetivos principales de esta Tesis Doctoral han sido:

1. Caracterización espacio-temporal de la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C y el posible papel como dominante negativo de la función sináptica *in vivo* en el ratón β Nrx1 Δ C.
2. Análisis del comportamiento asociado al autismo en ratones β Nrx1 Δ C y de la posible reversibilidad al apagar la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C en etapas adultas.
3. Estudio de las rutas y mecanismos candidatos afectados por la disfunción de β Nrxn1 en ratones β Nrx1 Δ C.
4. Disección de los circuitos sinápticos y cerebrales relacionados con la interacción social y afectados por la disfunción postnatal de β Nrxn1.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

1.1 Mantenimiento de células HEK293T

La línea celular HEK293T proviene de células embrionarias de riñón humano, transformadas con los genes E1A y E1B. Se utilizaron en esta tesis por su facilidad para ser transfectadas y sobreexpresar proteínas exógenas. El mantenimiento de las células HEK293T se realizó en frascos de cultivo (Biofil) con medio de cultivo DMEM (Gibco) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS HyClone, Thermo Fisher Scientific), 2mM glutamax (Gibco) y 100U/ml penicilina + 100µg/ml estreptomicina (Gibco). Las células se mantuvieron en un incubador en condiciones estables a 37°C y con 5% de CO₂.

1.2 Transfección de células HEK293T

Células HEK293T sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos el día anterior se transfectaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante y con un máximo de 500ng de DNA plasmídico por pocillo. Las células se mantuvieron en el incubador durante 24-48 horas para permitir la expresión de las proteínas exógenas.

1.3 Producción lentiviral

Todos los protocolos que incluyen manejo de lentivirus se realizaron en una campana de seguridad biológica clase 2 (Telstar) y los residuos generados se desinfectaron con lejía y se desecharon en un contenedor de residuos sanitarios infecciosos. La producción de partículas lentivirales se realizó como ha sido descrito previamente (Gascón et al., 2008). Por cada cada preparación lentiviral se utilizaron dos placas de cultivo de 15cm de diámetro, cada una sembrada con 15×10^6 células HEK293T en un

volumen de 25ml de medio de cultivo. A las 24 horas de la siembra se descartaron 5ml de medio y tras 1 hora se transfectaron las células mediante el método de fosfato cálcico con los siguientes plásmidos: pCAG-VSVg Δ C, Δ 8.9 y el vector lentiviral de transferencia. pCAG-VSVg Δ C codifica para la proteína de la cápsida del virus de la estomatitis vesicular (VSV) sin el epítipo VSV para evitar problemas de reacción cruzada con anticuerpos anti VSV. Δ 8.9 codifica para la maquinaria de retrotranscripción e integración del material génico. El vector lentiviral codifica la secuencia de interés bajo el control del promotor de sinapsina. La mezcla de DNA plasmídico (20 μ g del vector lentiviral específico, 20 μ g de Δ 8.9 y 10 μ g de VSVg) se incubó con 200 μ l CaCl₂ 2.5M y agua estéril hasta completar 2ml. Posteriormente, gota a gota y en agitación sobre el vórtex se añadieron 2ml de HBS 2x pH 7.05 (1,5 mM Na₂HPO₄, 280 mM NaCl, 50 mM HEPES). Se mezclaron los componentes por burbujeo durante 1 minuto, provocado por la expulsión de aire con un pipeteador automático acoplado a una pipeta serológica de 1ml. La mezcla se añadió gota a gota a la placa de cultivo mientras ésta se agitaba lentamente. Las células se incubaron durante 4 horas a 37°C, se lavaron con PBS atemperado y se añadieron 20ml de medio nuevo.

Tras 72 horas de expresión se procedió a la recolección de las partículas virales generadas. El medio se centrifugó a 2.000rpm durante 5 minutos para eliminar restos celulares y se filtró con una membrana de SFCA de 0.45 μ m de poro (Nalgene). El medio filtrado se pasó a tubos Ultra-Clear de 38.5ml (Beckman Coulter) y las partículas virales presentes se concentraron mediante ultracentrifugación a 25.000rpm durante 90 minutos en la ultracentrífuga Optima L-100 XP con el rotor Sw32 Ti. El pellet se resuspendió en 100 μ l de PBS frío y se dejó a 4°C durante 24 horas. Pasado este tiempo, la preparación lentiviral se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su uso.

1.4 Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata

Los cultivos de neuronas de hipocampo se realizaron a partir de embriones E18 de ratas gestantes Wistar provenientes del Servicio de Producción y Experimentación animal del IBiS. La rata gestante se sacrificó por inhalación de CO₂ y se extrajo por cesárea el útero con los embriones. Los cerebros de los embriones se colocaron en una

placa de 6cm de diámetro con DMEM suplementado con 2mM de Glutamax sobre hielo. Bajo la lupa de disección, se extrajeron los hipocampos con unas pinzas de punta fina Dumont #5 (Fine Scientific Tools) y se distribuyeron en placas de 3.5cm de diámetro conteniendo 2ml de DMEM suplementado con 2mM de Glutamax. En la campana de flujo laminar se practicaron dos cortes con un escalpelo a cada hipocampo y se añadieron 2.2ml de tripsina al 2.5% (Gibco) y se dejó actuar en el incubador durante 30-40 minutos. Los hipocampos se disgregaron mecánicamente en un tubo con 2ml de medio DB1 haciéndolos pasar 20 veces de forma secuencial por pipetas Pasteur con aperturas reducidas al fuego al 50 y 25%.

Las células disgregadas se contaron utilizando azul de Tripán en una cámara Neubauer. Se sembraron 65.000 células por pocillo de una placa de 24 pocillos previamente tratadas de las placas con poli-D lisina 0.5mg/ml en ácido bórico filtrado 75mM pH 8.2. Las células se cultivaron en medio DB1 (DMEM, suplementado con 10% suero fetal bovino, 44.4mM D (+) glucosa (Sigma), 2mM Glutamax, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina) durante 2.5 horas en el incubador. Posteriormente, el medio de siembra DB1 se sustituyó con medio Neurobasal-B27 (Neurobasal (Gibco), B27 (Invitrogen), 2mM Glutamax, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina) atemperado y equilibrado.

1.5 Infección de cultivos neuronales

Las neuronas crecidas en pocillos de placas de 24 pocillos se infectaron a día in vitro (DIV) 3 bajo una campana de seguridad biológica añadiendo la cantidad establecida de partículas lentivirales concentradas y se permitió la expresión durante 10 días.

2. Aspectos generales derivados del trabajo con un modelo animal

2.1 Normativa del uso de animales de experimentación

Todos los procedimientos con animales de experimentación animal realizados en esta Tesis Doctoral siguieron la normativa marcada por el Real Decreto 53/2013, en el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y fueron realizados por personal cualificado. Todos los experimentos realizados con animales en esta tesis doctoral han sido aprobados por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla.

La estabulación de animales se realizó en Centros de experimentación animal autorizados por la Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente (ES410910008010, ES410910008015 y ES410910008009). Los ratones se mantuvieron con temperatura constante de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, acceso ilimitado a comida y agua, y en habitaciones con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno, de acuerdo a las directrices europeas (Directiva 2010/63/EU).

Los animales destinados a la extracción de muestras se sacrificaron mediante dislocación cervical. En casos indicados, el sacrificio se realizó mediante anestesia letal con inyección intraperitoneal de Tiobarbital (Braun). Para los procedimientos que requerían recuperación tras la anestesia se utilizó una mezcla de Ketamina/Xilacina en proporción 80/20 con concentraciones 100mg/kg de Ketamina (Ketolar, Grupo Pfizer) y 12mg/kg de xilacina hidroc loruro de xilacina (Rompum, Bayer).

2.2 Procedencia de la línea de ratones $\beta\text{Nrx1}\Delta\text{C}$

La línea de ratones doble transgénica $\beta\text{Nrx1}\Delta\text{C}$ (CaMKII α -tTA;TRE-HA- $\beta\text{Nrx1}\Delta\text{C}$) procede del cruce de ratones simples transgénicos TRE-HA- $\beta\text{Nrx1}\Delta\text{C}$ con simples transgénicos CaMKII α -tTA. El transgén TRE-HA- $\beta\text{Nrx1}\Delta\text{C}$ fue generado en nuestro laboratorio e insertado mediante inyección pronuclear en el genoma de ratones de la cepa FVB en el Servicio General de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Los ratones TRE-HA- $\beta\text{Nrx1}\Delta\text{C}$ se retrocruzaron durante 4 generaciones con ratones de la cepa C57BL6/J. La línea de ratones simples transgénicos CaMKII α -tTA se generó por Mayford et al. (1996) y fue generosamente cedida a nuestro laboratorio por el Dr. Ángel Barco en la cepa de ratón C57BL6/J. Como control, se utilizaron ratones *wild-type*, simples transgénicos TRE-HA- $\beta\text{Nrx1}\Delta\text{C}$ y

simples transgénicos CaMKII α -tTA hermanos de camada. La identificación de los ratones se realizó colocando micro-etiquetas codificadas en la oreja.

2.3 Extracción de DNA y genotipado de ratones

El genotipado de los ratones se realizó mediante amplificación por PCR. Muestras de 1-2mm del extremo de la cola. Se incubó durante 45 minutos a 95°C en 75 μ l de buffer A (25mM NaOH, 0.2mM EDTA) y se neutralizó con 75 μ l de buffer B (40mM Tris-HCl pH 5.5).

Para la reacción de PCR se utilizaron 50ng de DNA, la polimerasa GoTaq Flexi (Promega) y las parejas de oligonucleótidos indicados en la tabla 2. La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems), utilizando el siguiente programa: 3 minutos de desnaturalización a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización (94°C 45segundos) hibridación (45segundos a 58°C) y extensión (45segundos a 72°C) con 7 minutos finales a 72°C. El producto resultante se migró en un gel de 0,8% agarosa (Pronadisa) disuelta en TAE (40 mM Tris pH 7.6, 20mM ácido acético, 1 mM EDTA) teñido con 0.002% SYBR *Safe* DNA *gel stain* (Invitrogen), mediante electroforesis en el equipo Mupid-one (Takara).

Fragmento amplificado	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
Control positivo	5'- GCTGGAAACGATCACATACCG -3'	5'- AGCTCCTGATGATCCAATGG -3'
TRE-HA- β Nrx1 Δ C	5'- ATCCACGCTGTTTTGACCTC -3'	5'- AACAGTGCTAAACCCGATGG -3'
CaMKII α -tTA	5'- CCTCGCAGACAGCGAATTC -3'	5'- TTGTGGACTAAGTTTGTTTC -3'

Tabla 2. Secuencias de las parejas de oligonucleótidos utilizadas para el genotipado de los ratones de la línea β Nrx1 Δ C por PCR.

3. Experimentos de comportamiento en ratones

Para evitar variaciones que pudieran afectar a los ensayos de comportamiento, como mínimo 3 días antes del comienzo los ratones se estabularon individualmente o por parejas en una jaula con serrín limpio, que no se cambió hasta la finalización de la

tanda de experimentos. Para disminuir el estrés por el manejo, el experimentador que realizó las pruebas manipuló los ratones en la sala de comportamiento durante 2-5 días antes de las pruebas comportamentales. El investigador no utilizó perfume y se evitó realizar ruidos que pudieran alterar los resultados. Los ratones se trasladaron a la sala de comportamiento un mínimo de 30 minutos antes del inicio de las pruebas de comportamiento, que se realizaron en la fase de luz y en la franja horaria de 8:00 a 15:00 horas.

3.1 Análisis SHIRPA

Antes de la realización de experimentos de comportamiento, las poblaciones de ratones se testaron con la batería de test primarios SHIRPA (SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital phenotype assessment) (Rogers et al., 1997) recogidas en la siguiente tabla:

Reflejo analizado	Observación o procedimiento
Posición corporal y actividades espontáneas	temblor, espasmos, saltos
Reflejo de enderezamiento	capacidad de girarse para apoyarse sobre las patas tras colocarle en decúbito prono
Fuerza de garras y extremidades	capacidad de agarrarse a una reja horizontal elevada cuando es volteada para dejarlos boca arriba durante un minuto
Curvatura del tronco	suspensión de la cola
Capacidad de visión	alargamiento de las extremidades anteriores cuando se acerca a una superficie suspendido por la cola
Reflejo auricular o de sobresalto auditivo	sobresalto que es producido por un ruido seco y fuerte sin que el ratón vea el origen
Reflejos faciales	estimulación táctil de la oreja, bigotes y párpado para evaluar la retirada de oreja y bigotes o cierre del ojo

Tabla 3. Tests de la batería SHIRPA evaluados.

3.2 Test de campo abierto

La prueba de campo abierto se realizó en un cuadrado de metacrilato gris de 45 x 45cm con paredes opacas (Harvard Apparatus). Se permitió al ratón explorar

libremente el espacio durante 15 minutos, mientras se grabaron sus movimientos. La detección automática del ratón mediante el programa Viewer 3 (Bioobserve) permitió analizar la distancia total recorrida y el tiempo invertido en la zona central (15x15cm).

3.3 Test de *rotarod*

El día antes del test los ratones tuvieron dos sesiones de entrenamiento separadas por 2 horas en un aparato *rotarod* acelerado (Ugo Basile 7650) con velocidad incrementada desde 4 a 20rpm durante 2.5 minutos. Desde el día 1 al 4 del test, se realizaron dos pruebas diarias a velocidad 4-40rpm durante 5 minutos. La latencia de caída de cada día se midió con el promedio de las dos sesiones.

3.4 Reconocimiento de nuevos objetos

El protocolo se realizó como ha sido descrito por otros (Leger et al., 2013; Vogel-Ciernia et al., 2014). En la caja del test de campo abierto se colocaron dos objetos idénticos distanciados entre ellos y adheridos a la base. El ratón del test exploró la caja y los objetos libremente durante 10 minutos. A las 24 horas, se reemplazó uno de los dos objetos por uno diferente y se vuelve a colocar el ratón durante 5 minutos, durante los que se contabilizó el tiempo de interacción con ambos.

3.5 Test de *self-grooming*

El ratón a evaluar se habituó durante 10 minutos a una jaula vacía y limpia. Durante los siguientes 10 minutos, se cuantificó el tiempo de acicalamiento y el número de eventos de *self-grooming*. Un evento se definió como la secuencia estereotipada de acicalamiento, la cual normalmente comienza en las patas delanteras, continúa en el cuerpo y finalmente en la cola. Aunque no siempre la realizaron al completo, se prefijó una duración mínima de un segundo realizando parte de esta secuencia para que un evento fuera cuantificado como tal.

3.6 Prueba de sociabilidad 3-chamber

La prueba de sociabilidad *3-chamber* se realizó en un aparato de metacrilato transparente específicamente diseñado para evaluar la interacción social (Panlab-Harvard Apparatus) (Moy et al., 2004). El área total (60x42cm) está dividida en tres estancias (una central y dos laterales, cada una de 20x42cm) conectadas entre sí mediante unas puertas que pueden ser bloqueadas por unas compuertas deslizantes. El protocolo del test de 3-chamber se realizó como ha sido descrito en la literatura (Moy et al., 2004) y consta de cuatro etapas de 10 minutos:

- i. Pre-habitación. El ratón se colocó en la estancia central, con las compuertas que comunican con las habitaciones laterales cerradas.
- ii. Habitación: El ratón podía moverse libremente por las tres habitaciones del aparato. En cada habitación lateral se colocó un cilindro enrejado. En esta fase se verificó que el ratón exploraba las dos habitaciones laterales, sin presentar preferencia por un lateral.
- iii. Fase de preferencia social. Dentro de los cilindros enrejados de las habitaciones laterales se colocaron los estímulos social o no social. El estímulo social consistió en un ratón desconocido de la misma cepa, edad y sexo que el ratón testado. El estímulo no social fue un objeto de unos 4cm de altura que no presentaba olor y situado centrado en el cilindro.
- iv. Fase de preferencia por la novedad social. Se reemplazó el objeto de la fase anterior (familiar) por un ratón desconocido (nuevo) de cepa, edad y sexo similar al ratón analizado.

Se cuantificó el tiempo de interacción con los estímulos presentados como el contacto directo del hocico con el cilindro.

3.7 Test de habituación/deshabituación de la olfacción

El protocolo se realizó según ha sido descrito (Yang & Crawley, 2009). El ratón se habituó durante 20 minutos a una jaula limpia sin serrín, cubierta por una rejilla. Durante los primeros 10 minutos de la habituación se colocó un bastoncillo de algodón en la rejilla, de manera que el algodón quedara situado a 9cm de altura desde la base de la jaula. Esta altura evitaba los encuentros causales con el algodón. El bastoncillo se eliminó durante el resto de la habituación. Posteriormente, se realizaron presentaciones secuenciales de 2 minutos de duración separadas de 1 minuto de bastoncillos impregnados en diferentes olores. En total se utilizaron 5 olores (agua, extracto de azahar, extracto de vainilla y orina de dos ratones C57BL/6J machos diferentes). Se consideró tiempo de interacción cuando el animal elevaba las patas delanteras acercando el hocico más de 1cm al algodón.

3.8 Test de enterramiento de comida

Los ratones se privaron de comida 24 horas antes de realizar este test (Yang & Crawley, 2009). El día de la prueba se colocó al ratón en una jaula con 3cm de serrín nuevo durante 5 minutos. Tras enterrar un pellet de comida bajo el serrín, se volvió a introducir al ratón y se cuantificó el tiempo transcurrido hasta desenterrar la comida.

4. Técnicas bioquímicas para el análisis de proteínas

4.1 Análisis de los niveles de proteínas mediante *western blot*

4.1.1 Obtención de lisados a partir de tejido

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical. Tras separar la cabeza del tronco, se separó la calota craneal para extraer el cerebro con una espátula. El tejido se introdujo en una placa de 6cm de diámetro que contenía PBS frío y se colocó sobre hielo para inhibir la degradación del tejido. Bajo una lupa de disección, se localizaron las estructuras cerebrales de interés, que se diseccionaron en el menor tiempo posible con unas pinzas de punta fina Dumont #5 (Fine Scientific Tools). El tejido diseccionado

se pasó a un tubo de microcentrífuga Eppendorf y se procesó inmediatamente o se congeló por inmersión en nitrógeno líquido.

Las proteínas se extrajeron con el buffer de lisis (Tris-HCl 50mM pH7.4, NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM, Tritón X-100 1%, SDS 0.1%) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete Mini EDTA-free tablets*, Roche). En el caso de los experimentos en los cuales se analizaron fosforilaciones de proteínas, el buffer se suplementó adicionalmente con un cóctel de inhibidores de fosfatasas (nº2, Sigma). Primero se realizó una disgregación mecánica utilizando un pistilo acoplado a un homogeneizador portátil a motor (VWR). Tras 10 minutos en hielo, las muestras se homogeneizaron pasándolas 5-10 veces por una jeringa de insulina de 27G (BD). Los restos insolubles se descartaron mediante la centrifugación del lisado a 13.000rpm durante 10 minutos a 4°C.

4.1.2 Obtención de lisados a partir de cultivos celulares

Las células sembradas en los pocillos se lavaron con PBS frío y tras retirarlo completamente se añadieron 100ul de buffer de lisis (Tris-HCl 50mM pH7.4, NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM, Tritón X-100 1%, SDS 0.1%) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas. Tras 10 minutos en hielo, las muestras se homogeneizaron pasándolas 5-10 veces por una jeringa de insulina de 27G. Los restos insolubles se descartaron mediante la centrifugación del lisado a 13.000rpm durante 10 minutos a 4°C.

4.1.3 Electroforesis y transferencia de las proteínas

Las muestras a analizar se equilibraron por concentración proteica total, cuantificada mediante el kit BCA (Thermo Fisher Scientific). El volumen de muestra necesario para obtener los µg de proteína requeridos se diluyó en buffer de carga (concentración final: 180mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.005% azul de bromofenol) y se añadió β-mercaptoetanol (BioRad) hasta una concentración final del 4% (568mM). Las

muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos para favorecer la desnaturalización de las proteínas.

Los geles de SDS-Bis Acrilamida para la separación de las proteínas desnaturalizadas se prepararon con un grosor de 1,5mm y 10 carriles. Contaban con dos fases de diferente concentración de bis-acrilamida 37.5:1. La solución apiladora al 4% de bis-acrilamida en la parte superior y la solución separadora al 8-12% de bis-acrilamida, según el peso molecular de las proteínas a testar, en la parte inferior. La electroforesis se realizó utilizando el sistema mini-Protean (Biorad) con buffer TGS (25mM Tris, 192mM Glicina, 0.1%SDS). Las muestras preparadas y el marcador de peso molecular (BluEYE, JetBiofil) se cargaron en los pocillos del gel y se aplicó una corriente constante de 100V. Las proteínas separadas se transfirieron mediante transferencia húmeda (25mM Tris, 192mM Glicina, 20% metanol) a una membrana PVDF de 0.45µm (Millipore), previamente activada con metanol 100%, mediante la aplicación de una corriente de 300mA durante 90 minutos.

Las uniones inespecíficas se bloquearon mediante la incubación durante 1 hora con 5% leche desnatada deshidratada (alternativamente 5% BSA para el reconocimiento de proteínas fosforiladas) en Tris Buffer Salino-Tween (TBS-T) (137mM NaCl, 20mM Tris, 1% Tween, pH 7.4). Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo (concentraciones en tabla 4) durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, siempre en agitación. Tras realizar 3 lavados de 10 minutos con TBS-T, la membrana se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa HRP (Jackson Immunoresearch) (Tabla 5) diluido 1:5000 en solución de bloqueo y posteriormente se lavó 3 veces durante 10 minutos. Para revelar la membrana se incubó con los reactivos Clarity (BioRad) o Supersignal-Femto (Thermo Fisher Scientific) durante 1-3 minutos y se detectó la quimioluminiscencia emitida con el aparato IQ-Las4000-mini Gold (GeneralElectric). Se tomaron imágenes digitales seriadas con quimioluminiscencia acumulada cada 10 segundos hasta la saturación de la señal.

Las imágenes obtenidas se cuantificaron mediante el software Quantity-One (BioRad). Se seleccionaron 3 imágenes con diferente tiempo de exposición no saturadas y se

trazó un rectángulo del área de una banda a analizar. Esta área se clonó sobre las demás bandas de la imagen y sobre una región correspondiente a la señal inespecífica. Se cuantificó la suma de la intensidad de los píxeles dentro de cada área, ajustado al fondo inespecífico. Este proceso se repitió para las exposiciones seleccionadas, clonando la disposición de las áreas de cuantificación.

4.2 Inmunoprecipitaciones de tejido

Todos los pasos de este protocolo se realizaron a 4°C o en hielo para evitar la degradación de las proteínas. Las estructuras cerebrales a analizar se diseccionaron y se homogeneizaron en buffer de IP (5mM CaCl₂, 20mM Tris pH7.5, 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂, 1% Tritón x-100) en presencia de inhibidores de proteasas (*Complete Mini EDTA-free tablets*, Roche). Posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 rpm para descartar el material insoluble. Para reducir las uniones inespecíficas a la resina se procedió a pre-clarear el lisado mediante la incubación durante 1 hora con resina de sefarosa unida a proteína G (GE Healthcare) previamente equilibrada en buffer de IP. Tras descartar la resina mediante una centrifugación de 2 minutos a 2.000rpm, un 10% del lisado preclareado se guardó a -20°C para analizarlos en el *western blot* como lisado de partida. Al resto se añadió el anticuerpo correspondiente y se incubó en rotación durante toda la noche a 4°C. Se añadieron 50µl de la resina diluida al 50% en buffer de IP y se incubó durante 1 hora en rotación para captar los inmunocomplejos. Tras centrifugar la muestra a 2.000rpm durante 2 minutos, se realizaron 3 lavados de la resina con 1ml de buffer, eliminado el sobrenadantes mediante centrifugaciones a 2.000rpm durante 1 minuto. Las proteínas se eluyeron añadiendo dos volúmenes de buffer de elución (180mM TrisHCl pH 6.8, 2% SDS) a la resina y se calentó a 95°C durante 5 minutos. Los complejos purificados se aislaron mediante una centrifugación de 5 minutos a 13.000rp y se suplementaron con 10% glicerol, 0.005% azul de bromofenol y 4% de β-mercaptoetanol. El material inmunoprecipitado se analizó mediante *western blot*.

4.3 Fraccionamiento subcelular de sinaptosomas

Durante todo el proceso de la purificación las muestras se mantuvieron en frío. La corteza de 2 animales del mismo genotipo se homogeneizó en 10ml de buffer A (5mM HEPES pH7.4, 0.32M sacarosa, 1mM NaHCO₃, 1mM MgCl₂, 0.5mM CaCl₂) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini EDTA-free tablets*, Roche) utilizando un homogeneizador de émbolo. Se guardó un 5% del volumen como *fracción L* (lisado). Tras centrifugar las muestras a 1.400g durante 10 minutos, se reservó el sobrenadante y se homogeneizó de nuevo el *pellet* con 4ml de buffer A. El homogeneizado se centrifugó a 710g durante 10 minutos, se descartó el *pellet* y el sobrenadante se combinó con el volumen del paso anterior. La mezcla se centrifugó en un tubo de pared fina *Ultra Clear* de 17ml (Beckman Coulter) durante 10 minutos a 13.800g en el rotor Sw32.1 Ti de la ultracentrífuga Optima L-100 XP (Beckman Coulter). Se guardó un 5% como *fracción SN* (sobrenadante) y se descartó el resto de la solución. El *pellet* se lisó en 3ml de solución B (6mM Tris-HCl pH8.0, 0.32M sacarosa, 1mM NaHCO₃) suplementado con inhibidores de proteasas utilizando un homogeneizador de émbolo constituyendo la *fracción M* (membrana)

Se preparó un gradiente discontinuo de sacarosa en un tubo de pared fina *Ultra Clear*[™] de 17ml (Beckman Coulter), con concentraciones decrecientes de sacarosa (1.2M, 1M y 0.85M de sacarosa), sobre el que se vertió el homogeneizado obtenido en el paso previo. Se centrifugó a 82.500g durante 2 horas en la ultracentrífuga. Se aspiró la banda correspondiente a los sinaptosomas entre las fases 1 y 1.2M con un pipeteador automático acoplado a una pipeta pasteur de vidrio (Figura 17). Se guardó el 75% del volumen recuperado como *fracción S* (sinaptosomas). El 25% restante se diluyó 1:1 en la solución C (12mM Tris-HCl pH8.0, 1% Tritón X-100) suplementado con inhibidores de proteasas, con la que se incubó durante 15 minutos para lisar los sinaptosomas. Las muestras se ultracentrifugaron a 32.800g durante 1 hora. El sobrenadante obtenido supone la *fracción Presináptica*, mientras que el *pellet* insoluble en Tritón X-100, se resuspendió mediante sonicación en buffer D (12mM Tris-HCl pH8.0, 1% NP-40) suplementado con inhibidores de proteasas constituyendo la *fracción postsináptica*.

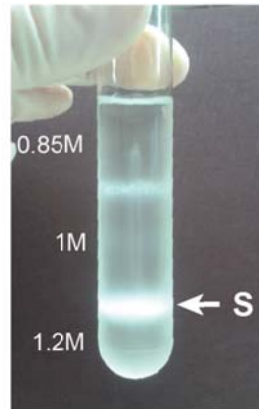


Figura 17. Gradiente discontinuo de sacarosa en el que se indica la fracción de sinaptosomas purificada (S).

4.4 Proteómica cuantitativa mediante iTRAQ de sinaptosomas

Las muestras de sinaptosomas se analizaron por el Servicio de Proteómica del IBiS. Primero, se realizó una reducción de los puentes disulfuro con 50mM de TCEP (tris-(2-carboxyethyl) phosphine, AB Sciex) seguida de una alquilación con 200mM de MTTs (methyl methanethiosulfonato, AB Sciex) y una digestión con tripsina porcina 1:10 (Promega). Los péptidos se marcaron etiquetas isobáricas iTRAQ 8 plex (AB Sciex). Las muestras se combinaron y se limpiaron con cartuchos Oasis HLB C18 (Waters), se pre-faccionaron en 13 fracciones mediante intercambio catiónico con columnas MCX Oasis (Waters) y se limpiaron posteriormente con cartuchos Oasis HLB C18 (Waters).

Los péptidos se separaron utilizando el sistema nano HPLC de Thermo (nano LC 1000) acoplado on-line al espectrómetro de masas Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Electron) equipado con una fuente de ionización nanospray (Proxeon Biosystems). Se realizó el barrido entre 200 y 1.800m/z con una resolución de 70.000 FWHM para un m/z igual a 100. Se seleccionaron hasta 15 precursores de los más intensos, con carga mayor o igual a 2, y se incorporaron en una lista de exclusión durante 60 segundos.

La identificación de proteínas se llevó a cabo de forma automática utilizando el motor de búsqueda Sequest HT y Percolator, ambos incluidos en el programa Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific). Los espectros de fragmentación MS/MS se enfrentaron contra la base de datos Uniprot con restricción taxonómica a *Mus*

musculus. Posteriormente se realizó la cuantificación relativa para cada etiqueta en función de las áreas de los picos. Se consideraron proteínas cuantificables aquellas que se identificaron con más de 2 péptidos con un nivel de confianza mayor o igual al 95% y un ratio con un *p-value* menor o igual a 0.05 y un factor de error (EF) menor de 2 con cada una de las etiquetas elegidas como referencia.

5. Análisis histológicos

5.1 Análisis de proteínas en cortes de tejido

5.1.1 Perfusión transcardíaca y seccionamiento del tejido

Los animales se anestesiaron con dosis letal de Tiobarbital (Braun) mediante inyección intraperitoneal. Cuando alcanzaron una anestesia profunda, se perfundieron transcardialmente con 50ml de PBS y 50ml de solución de fijación (4% paraformaldehído en PBS, pH7.4). Posteriormente, se extrajo el cerebro y se post-fijó mediante inmersión en solución de fijación a 4°C durante 24 horas.

La inclusión en bloques y los cortes de tejido se realizaron por el Servicio de Histología del IBiS. En el caso de la inclusión en bloques de OCT, el cerebro fijado se deshidrató por inmersión en una solución de 30% de sacarosa en PBS durante 48 horas a 4°C. Posteriormente, se incluyó el cerebro en OCT líquido y se congeló sobre nieve carbónica. Los bloques se cortaron a 25µm en criostato (Leica).

En el caso de utilizar parafina, el cerebro fijado se procesó con el procesador de tejidos del Servicio de Histología del IBiS para incluirlo en bloques de parafina. Se realizaron secciones coronales a 10µm de grosor en un micrótopo que se colocaron en portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific). Antes de realizar la tinción, los tejidos seleccionados se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en una secuencia decreciente de etanol (100-70%). A continuación, se realizó el desenmascaramiento

antigénico por calor con la solución de Tris-EDTA (10mM Tris-Base, 1mM EDTA, pH9.0) a 121°C en una olla a presión de laboratorio (Aptum Biologics).

5.1.2 Inmunofluorescencia de tejido

Cortes de tejido se incubaron con la solución de permeabilización-bloqueo (5% suero de asno, 1% BSA y 0.3% de tritón X-100) a temperatura ambiente. Posteriormente, el tejido se incubó con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo (5% de suero de asno, 1% BSA y 0.1% de tritón X-100) a 4°C durante toda la noche. El tejido se lavó 3 veces durante 10 minutos con PBS y se incubó con los anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente (Tabla 5). Tras 3 lavados con PBS, las preparaciones se montaron con Fluoromont-G (Southern Biotech).

5.1.3 Inmunohistoquímica

El bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena se realizó incubando los cortes de tejido con 0.006% H₂O₂, 0.02% metanol, en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBS, se aplicó una solución de permeabilización-bloqueo (0.3% tritón X-100, 5% suero de cabra, 1% BSA en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se diluyó en solución de bloqueo (0.1% tritón X-100, 5% suero de cabra, 1% BSA en PBS) y se incubó a 4°C durante toda la noche. Tras 3 lavados de 10 minutos con PBS, el tejido se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado diluido en PBS-T (0.1% Tritón-X100 en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente (Tabla 5). Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y el tejido se incubó 1 hora con avidina/biotina-HRP mediante el kit de tinción peroxidasa ABC (Vectastain). Se lavó 2 veces durante 15 minutos con PB 0.1M pH7.5 (81mM HNa₂O₄P, 19mM H₂NaO₄P) y se aplicó el sustrato diaminobenzidina (DAB) con potenciación de níquel (1%DAB, 0.05% sulfato amónico de níquel, 0.033% H₂O₂ en PB 0.1M pH7.5). Los tiempos de revelado fueron establecidos para cada anticuerpo en base al fondo y la señal de cada uno. Por último, las muestras se deshidrataron en una cadena de etanol (50-100%)-xilol y se montaron con DPX (Merk).

5.2 Tinción de Golgi-Cox

5.2.1 Preparación de las muestras

El protocolo se realizó como se ha descrito anteriormente (Glaser et al., 1981; Marco et al., 2013). Todos los pasos que requirieron la incubación con la solución Golgi-Cox se realizaron en oscuridad y a temperatura ambiente.

La solución Golgi-Cox (1% dicromato potásico, 1% cloruro de mercurio, 0,8% cromato potásico) se preparó 5 días antes de su uso para poder descartar los precipitados que se forman al inicio. El cerebro fresco se separó en dos hemisferios y se sumergió en solución Golgi-Cox durante 48 horas, tras las cuales se renovó la solución y se incubó durante 3 semanas. Finalizada la incubación los cerebros se lavaron 3 veces con agua destilada durante 2 minutos y 1 vez con 90% etanol durante 30 minutos. Los cerebros se sumergieron en 70% etanol y se cortaron en secciones de 200 μ m en el plano coronal con vibratomo (Leica). Los cortes se lavaron con agua destilada y se redujeron con solución de amoniaco al 15% durante 1 hora. Tras un lavado en agua el tejido se fijó con 1% de tiosulfato de sodio durante 7 minutos, posteriormente eliminado con agua destilada. Los cortes se montaron sobre portaobjetos Superfrost-Plus (Thermo Fisher Scientific) y se deshidrataron en una secuencia de etanol-isopropanol-xilol (3 minutos en etanol 50-70-80-100%, 2 veces 5 minutos en isopropanol:etanol 2:1, 5 minutos en isopropanol 100%, 2 veces 5 minutos en xilol 100%). Las preparaciones se montaron con DPX (Merk).

5.2.2 Toma de imágenes y análisis cuantitativo de espinas dendríticas

La toma de imágenes de la tinción de Golgi-Cox se realizó en el microscopio BX-61 (Olympus). Tras localizar la región de interés se realizó la búsqueda de neuronas con la morfología adecuada y de calidad suficiente para ser analizadas. Con el objetivo 100x se tomaron imágenes de las neuronas seleccionadas en planos seriados del eje Z separados 0.5 μ m entre sí para enfocar todo el árbol dendrítico (aproximadamente 70 imágenes por neurona).

La cuantificación de la densidad de espinas dendríticas se realizó utilizando el programa ImageJ (NIH). Se utilizaron las secuencias de imágenes que cubrían los diferentes planos focales para visualizar los segmentos dendríticos. Se fijó la longitud del segmento dendrítico a analizar y se cuantificó manualmente el número de las espinas dendríticas presentes en ese segmento. Tras calcular la densidad de espinas dendríticas de los segmentos, se calculó el promedio de densidad de los segmentos de cada neurona y posteriormente de todas las neuronas de cada grupo de animales

6. Análisis de la expresión génica

6.1 Extracción RNA

La zona de trabajo y el material se limpió con Rnase-ExitusPlus (Appllichem). Todo el material desechable y soluciones utilizadas para trabajar con mRNA disponían del certificado de libres de DNAsas y RNAsas de la compañía correspondiente. En el caso de la extracción de RNA a partir de tejido, las estructuras cerebrales se diseccionaron en el menor tiempo posible para impedir la acción de RNAsas tisulares. El tejido diseccionado fue congelado inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Para la extracción de RNA a partir de células, se retiró el medio a los pocillos y se lavaron con PBS sobre hielo. El RNA se extrajo en ambos casos utilizando el kit RNeasy (Quiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.2 Análisis del transcriptoma

Las muestras de RNA se preamplificaron e hibridaron con el *array* GeneChip® *Mouse Transcriptome Assay* 1.0 (MTA1.0) de Affymetrix en el Servicio de Genómica del IBiS. Los datos crudos de la intensidad de señal producida por la hibridación del transcriptoma con las sondas dispuestas en el *array* fueron analizados por la Unidad de Genómica del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (Cabimer, Sevilla). El análisis bioestadístico constó principalmente de dos pasos: normalización de los datos y análisis de varianza de perfiles diferenciales en las dos

condiciones experimentales. Los datos fueron normalizados por RMA (Robust Multiarray Average), cuyos resultados permiten comparar directamente el valor de expresión de un gen en las diferentes condiciones. Posteriormente, se procedió al análisis estadístico con LIMMA (Linear Models for Microarray Analysis) utilizando el paquete oneChannelGUI, basado en R, y se obtuvieron los valores de cambio de expresión génica y su *p-value*.

6.3 RT-qPCR

La retrotranscripción a cDNA se realizó utilizando el kit Quantitect (Quiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este protocolo consta de un paso de eliminación de DNA genómico y otro de retrotranscripción a cDNA con oligonucleótidos al azar. Para la amplificación por PCR se utilizaron sondas comerciales TaqMan, unidas al fluoróforo FAM y el inhibidor de fluorescencia TAMRA (Applied-Thermo Fisher Scientific) (Tabla 6), junto con la enzima iTaq y la referencia pasiva ROX (BioRad). Las mezclas de reacción se combinaron con 12.5ng de cDNA en placas de 96 o 384 pocillos (Applied-Thermo Fisher Scientific). La reacción de amplificación se realizó en el aparato ViiA7 (Applied-Thermo Fisher Scientific), utilizando el protocolo recomendado por el fabricante.

Símbolo gen	Sonda TaqMan	Fluoróforo
Hprt	Mm00446968_m1	FAM-MGB
Esyt2,	Mm00466339_m1	FAM-MGB
Actb	Mm00607939_s1	FAM-MGB
Ddit4l	Mm00513313_m1	FAM-MGB
Igsf9b	Mm02600482_m1	FAM-MGB
Hprt	Mm00446968_m1	FAM-MGB
Ptprn2	Mm01229147_m1	FAM-MGB
Npsr1	Mm00558817_m1	FAM-MGB
Arc	Mm01204954_g1	FAM-MGB
Nr4a1	Mm01300401_m1	FAM-MGB
Fos	Mm00487425_m1	FAM-MGB

Snca	Mm01188700_m1	FAM-MGB
Nps	Mm03990645_m1	FAM-MGB
Syt10	Mm00444512_m1	FAM-MGB
Abi3bp	Mm00618913_m1	FAM-MGB
Ror1	Mm00443463_m1	FAM-MGB
Gpr83	Mm00439103_m1	FAM-MGB
Wdr60	Mm00524728_m1	FAM-MGB
Jam3	Mm00499214_m1	FAM-MGB

Tabla 6. Sondas Taqman utilizadas en las reacciones de qPCR.

Obtuvimos como resultado el Ct (del inglés *Threshold Cycle*) de cada pocillo, que corresponde al ciclo de amplificación en el que el transcrito comienza a ser detectable por encima de un umbral. Tras verificar que la diferencia entre las dos réplicas era menor que 0.5 ciclos de amplificación, se calculó el promedio del Ct de cada condición. Mediante la comparación del Ct promedio con el obtenido para el gen de referencia (*Hprt1*), obtuvimos el valor de ΔCt para cada condición. Este valor se referenció al valor promedio de ΔCt de las muestras control para calcular el $\Delta\Delta\text{Ct}$, que está en escala logarítmica en base 2. El resultado se expresó en escala lineal mediante el cálculo de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

7. Determinación de los niveles de eCBs

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo el cortex cerebral en el mínimo tiempo posible en una cámara fría. Las muestras se introdujeron en un tubo tipo eppendorf y se pesaron en una báscula de precisión antes de congelarlas en nitrógeno líquido y guardarlas a -80°C . El proceso desde el sacrificio hasta la congelación fue de aproximadamente 3 minutos en promedio. Las muestras se enviaron en hielo seco al laboratorio del Dr Rafael de la Torre (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, Barcelona), donde se extrajeron los compuestos lipídicos y se cuantificó la concentración de eCBs mediante LC-MS/MS, utilizando análogos deuterados de AEA y 2-AG como estándares internos.

8. Cirugía para inyección lentiviral por estereotaxia

Los ratones se anestesiaron con Ketamina/xylacina (100mg/kg y 12mg/kg respectivamente) (Pfizer) intraperitonealmente. Se colocó al animal sobre una manta eléctrica para ayudar a mantener la temperatura corporal durante la cirugía. Tras fijar el cráneo al aparato estereotáxico (Stoelting) se practicó una incisión con un bisturí en el eje AP de la parte superior del cráneo. Se localizó Bregma para alinear el cráneo y calcular las coordenadas AP y ML de inyección (AP + 0.5 mm, ML +/- 2 mm). Se perforó el hueso utilizando un taladro acoplado a una fresa de 1.6mm (Dremel). La duramadre se retiró con unas pinzas de punta fina Dumont #5 (Fine Scientific Tools).

La segunda parte de la cirugía se realizó dentro de una campana de seguridad biológica clase 2 (Telstar). Se utilizó una jeringa de inyección con una aguja de 35G de punta roma (WPI), acoplada a un microinyector automático (WPI) sujeto al aparato estereotáxico (Figura 18). Tras cargar la jeringa con 4µl de la preparación lentiviral correspondiente, se calcularon las coordenadas DV con respecto a Bregma (DV - 3.5 y - 3.0mm) y se inyectó 1µl en cada punto comenzando por el de mayor profundidad, a una velocidad constante de 200nl/minuto. Se esperaron 3-5 minutos después de cada inyección para retirar la aguja. Posteriormente, se cubrió el agujero del cráneo con cera ósea y se practicaron 3-4 puntos de sutura. Se permitió la recuperación de la anestesia dentro de su jaula y sobre una placa calefactora.

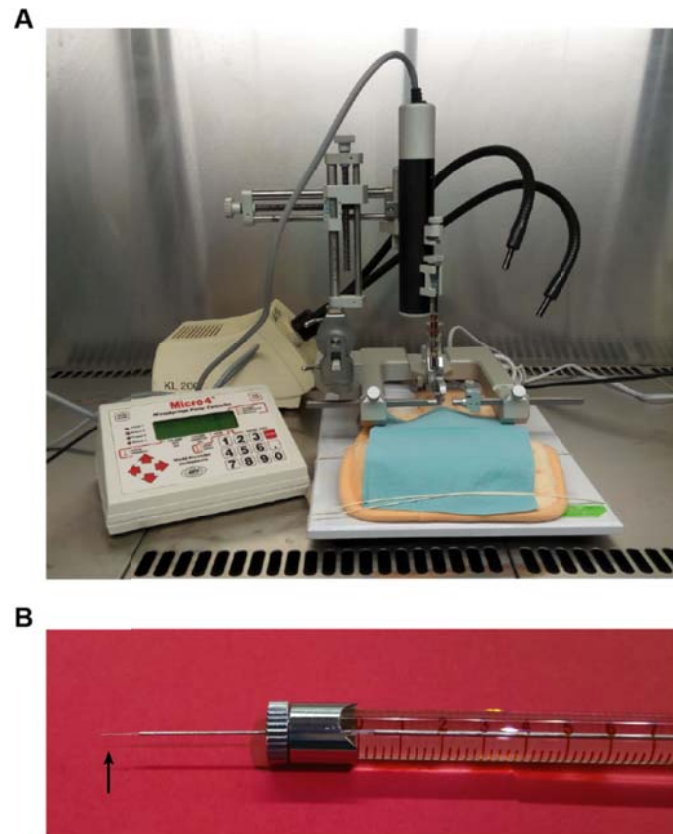


Figura 18. Material utilizado para la inyección lentiviral por estereotaxia. A.- Aparato esterotáxico acoplado al microinyector. B.- Detalle de la aguja de inyección. Se señala el extremo de la aguja de inyección de 35G.

9. Experimentos de electrofisiología

9.1 Electrofisiología en rodajas

El registro de electrofisiología en rodajas se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Rafael Fernández Chacón (IBiS) con el procedimiento ya descrito (Rabaneda et al., 2014). Las neuronas piramidales de la capa 5/6 de la corteza somatosensorial se identificaron bajo el microscopio y se realizaron registros de célula completa utilizando un amplificador double patch clamp EPC10 plus (HEKA). Los registros de mIPSCs se realizaron en presencia de 0.001 mM tetrodotoxin (TTX; Sigma) y 2 mM ácido

quinurénico (Sigma) en la solución extracelular, mientras que las mEPSCs se registraron en presencia de 0.001 mM TTX y 0.05 mM picrotoxina (Sigma) en el medio extracelular.

9.2 Registro de LFP *in vivo*

Todos los procedimientos explicados en este apartado se realizaron en colaboración con el grupo de los Drs. Agnès Gruart y José María Delgado y se llevaron a cabo en las instalaciones de la División de Neurociencias de la Universidad Pablo de Olavide.

9.2.1 Preparación de los electrodos y cirugía para la implantación

Cada electrodo de registro de LFP se construyó con dos cables de tungsteno de 50µm con Teflón de aislamiento (Advent Research Materials), enrollados y unidos entre sí con pegamento (Loctite). Los 100µm del extremo de cada cable se dejaron libres de aislamiento para servir de puntos de registro, separados entre sí por 25µm.

Los ratones destinados al estudio de electrofisiología *in vivo* fueron trasladados al animalario de la División de Neurociencias de la Universidad Pablo de Olavide, donde se aclimataron durante una semana previa a la cirugía. La primera parte de la cirugía (anestesia, localización de coordenadas estereotáxicas y trepanación) se realizó como ha sido explicado en el *Cirugía para inyección lentiviral por estereotaxia* de esta Tesis Doctoral. Los electrodos se posicionaron en un brazo adicional del aparato estereotáxico y se introdujeron en el parénquima cerebral hasta alcanzar las coordenadas DV establecidas a partir de la superficie cerebral (tabla 7), tras lo que se fijaron con pegamento (Loctite) al cráneo. Se colocó un tornillo de acero inoxidable con hilo de plata de 0.1mm en el cráneo como toma de tierra. Los electrodos y la toma de tierra se soldaron a un conector (RSAmidata) y el dispositivo se fijó al cráneo con dos tornillos de acero inoxidable y cemento dental (Dentalay). Por último, se practicaron los puntos de sutura necesarios y se permitió la recuperación del animal sobre una placa calefactora. Entre la cirugía y el experimento de comportamiento se dejó pasar una semana para favorecer la recuperación de los animales.

	AP	ML	DV
S1BF	- 1,0 mm	+ 2,8 mm	3,0 mm
CPu	+ 0,5 mm	+ 2.25 mm	2,2 mm
PrL	+ 1,94 mm	+ 0.3 mm	1,0 mm

Tabla 7. Coordenadas utilizadas para implantar los electrodos de registro de LFP. Las coordenadas del eje antero-posterior (AP) y medial-lateral (ML) se tomaron con respecto a Bregma. El eje dorso-ventral (DV) se midió desde la superficie cerebral.

9.2.2 Adaptación del test de *3-chamber* para el registro *in vivo*

Se realizaron las siguientes adaptaciones sobre el aparato y el protocolo del test de sociabilidad *3-chamber* para compensar la limitación de movilidad generada por los cables de registro:

- Se sustituyeron las paredes entre habitaciones por tabiques parciales
- Los cilindros enrejados se colocaron centrados en las habitaciones laterales
- A lo largo del eje longitudinal del aparato se colocó un raíl por el que se desplazaba una polea conectada a un contrapeso, que sirve de soporte a los cables de registro. De esta manera, la mayor parte del peso de los cables estaba soportada por dicha estructura (Figura 19).
- Las fases de habituación y evaluación del test se modificaron de la siguiente manera: i) Los ratones se aclimataron durante 3 días a la colocación de los cables fuera del aparato; ii) durante los 2 días siguientes se habituaron al aparato con los cables conectados; iii) se redujeron las fases del experimento para disminuir el cansancio del animal. Se suprimió la fase de habituación a la habitación central y se acortó a 5 minutos el tiempo de habituación al aparato completo. La duración de las fases de preferencia social o preferencia por la novedad social no se modificaron con respecto al protocolo habitual (10 minutos de duración cada una).

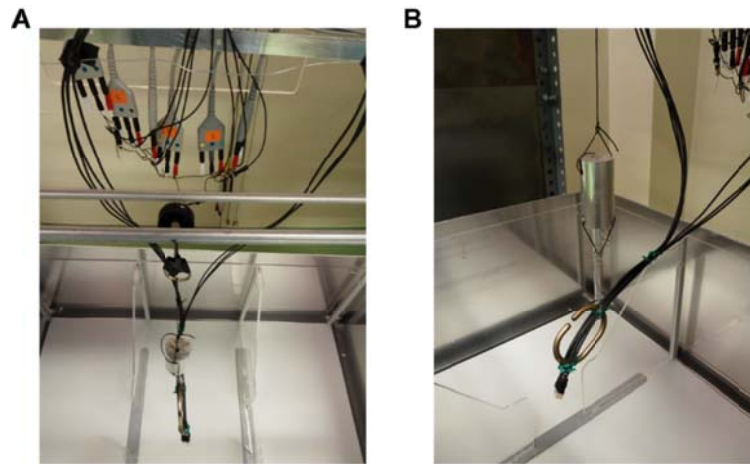


Figura 19. Algunas de las modificaciones realizadas en el aparato *3-chamber*. A.- Raíl y polea. B.- Contrapeso unido a la polea que sujeta los cables. Nótese también el tabique parcial que separa la estancia lateral.

9.2.3 Registro y análisis de LFP

Los registros de LFP se llevaron a cabo con un amplificador diferencial Grass P511 con un ancho de banda de 0.1Hz-10kHz (Grass-Telefactor). Los registros se muestrearon con una frecuencia de 5.000Hz. Inmediatamente antes del comienzo del registro se introdujo el cable adaptador en el conector situado sobre el cráneo del ratón. Se aplicó un filtro de 50Hz para reducir la interferencia producida por los aparatos electrónicos a esa frecuencia. El registro del LFP y el vídeo del comportamiento se guardaron en archivos sincronizados.

El análisis de LFP se realizó por Florbela da Rocha Almeida. Las ondas generadas durante los segmentos a analizar se extrajeron con el programa Spike2 (CED 1401 Plus; Cambridge Electronics Design) y se analizaron con el método *multi-taper* de la transformada de Fourier del paquete Chronux 2.12 (<http://www.chronux.org>) (Mitra & Bokil, 2008) de Matlab. Se utilizaron las funciones *mtspectrumc* (poder espectral) y *mtspecgramc* (espectrograma – representación tiempo/frecuencia) para calcular la amplitud y el número de armónicos para cada instante de las secuencias seleccionadas y obtener el valor de poder espectral correspondiente. Los rangos seleccionados para el cálculo del poder espectral fueron: delta 1.5-4Hz, theta 4-10Hz, beta 10-30Hz y gamma 30-100Hz.

10. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo primario	Compañía	Dilución de uso	Especie de origen
anti-actina	Sigma-aldrich	1:1000	conejo
anti-βNrxn1	Neuromab	1:1000	ratón
anti-Cask	BD	1:1000	ratón
anti-Ddit4l	abcam	1:1000	ratón
anti-Gefirina	Synaptic Systems	1:1000	ratón
anti-GFP	Roche	1:1000	ratón
anti-GluA1	Santacruz	1:200	ratón
anti-GlurA2	Neuromab	1:1000	ratón
anti-GluN1	Synaptic Systems	1:1000	ratón
anti-HA	Roche	1:500	rata
anti-Igsf9b	Sigma	1:500	conejo
anti-Liprina α3	Synaptic Systems	1:500	conejo
anti-LRRTM2	NeuroMab	1:1000	ratón
anti-mGlu5	Millipore	1:1000	conejo
anti-Mint1	BD	1:1000	ratón
anti-Munc18-1	Synaptic Systems	1:2000	conejo
anti-NL1	Neuromab	1:1000	ratón
anti-NL2	Synaptic Systems	1:1000	ratón
anti-NL3	Neuromab	1:1000	ratón
anti-PSD95	Thermo scientific	1:1000	ratón
anti-PS6 ser 235/236	Cell Signalling	1:2000	conejo
anti-PS6 ser 240/244	Cell Signalling	1:1000	conejo
anti-PV	Swant	1:2000	conejo
anti-Rim1α	Synaptic Systems	1:1000	conejo
anti-sinapsina	Synaptic Systems	1:1000	conejo
anti-SNAP25	Sigma	1:3000	ratón
anti-VAMP2	Synaptic Systems	1:2000	ratón
anti-VGAT	Synaptic Systems	1:2000	conejo
anti-vGluT	Synaptic Systems	1:2000	conejo

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo secundario	compañía	Dilución de uso	especie de origen
anti-rata-HRP	Jackson ImmunoResearch	1:5000	cabra
anti-ratón-HRP	Jackson ImmunoResearch	1:5000	cabra
anti-ratón cadena ligera-HRP	Jackson ImmunoResearch	1:5000	cabra
anti-conejo-HRP	Jackson ImmunoResearch	1:5000	cabra

anti-rata-cy2	Jackson ImmunoResearch	1:800	asno
anti-ratón-cy3	Jackson ImmunoResearch	1:800	asno
anti-rata-biotina	Jackson ImmunoResearch	1:800	cabra

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados

11. Plásmidos utilizados

Durante esta Tesis se han utilizado los siguientes vectores de expresión:

Nombre de la construcción	Especie	Promotor	Resistencia
pCAG-HA- α Nrxn1	<i>Rattus norvegicus</i>	β -actina de pollo	Ampicilina
pCAG-HA- β Nrxn1 AS4-	<i>Rattus norvegicus</i>	β -actina de pollo	Ampicilina
pCAG-HA- β Nrxn2 AS4-	<i>Rattus norvegicus</i>	β -actina de pollo	Ampicilina
pCAG-GFP	<i>Aequorea victoria</i>	β -actina de pollo	Ampicilina
pCAG-HA-NL1 (AB)	<i>Rattus norvegicus</i>	β -actina de pollo	Ampicilina
pNICE-HA-NL2	<i>Rattus norvegicus</i>	CMV	Kanamicina
pCDNA3-HA-NL3	<i>Rattus norvegicus</i>	β -actina de pollo	Ampicilina
pCAG-HA-NL4	<i>Rattus norvegicus</i>	β -actina de pollo	Ampicilina
pENTR 223.1 LRRTM2	<i>Homo sapiens</i>		Espectinomicina
pLL-Syn-HA- β Nrx1 (-Sp4)-WPRE	<i>Rattus norvegicus</i>	sinapsina humana	Ampicilina
pLL-Syn-HA- β Nrx1 Δ C (-Sp4)-WPRE	<i>Rattus norvegicus</i>	sinapsina humana	Ampicilina
pLL-Syn-WPRE-Syn-GFP-WPRE	<i>Aequorea victoria</i>	sinapsina humana	Ampicilina
pCMS-egfp	<i>Aequorea victoria</i>	CMV	Ampicilina
pCMS-Egfp Ddit4	<i>Rattus norvegicus</i>	CMV	Ampicilina
pCMV6-Myc_DDK-Ddit4I	<i>Mus musculus</i>	CMV	Neomicina/Kanamicina

Tabla 8. Plásmidos utilizados.

V. RESULTADOS

1. Caracterización de la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C *in vivo* en el ratón doble transgénico β Nrx1 Δ C

Como ya hemos mencionado en los Antecedentes de esta Tesis Doctoral, la línea de ratón β Nrx1 Δ C fue generada mediante el sistema Tet-off con los transgenes CaMKII-tTA y TRE-HA- β Nrx1 Δ C para dirigir la expresión postnatal a neuronas principales del prosencéfalo. Como primer abordaje de la caracterización de la línea de ratón β Nrx1 Δ C (CaMKII-tTA;TRE-HA- β Nrx1 Δ C) realizamos una descripción en profundidad de la expresión espacio-temporal de la proteína transgénica para validar el modelo empleado. Posteriormente analizamos el posible papel de HA- β Nrx1 Δ C como dominante negativo de β Nrxn1 en la funcionalidad de la sinapsis *in vivo*.

1.1. Expresión espacio-temporal de la proteína HA- β Nrx1 Δ C *in vivo*

Con el objetivo de analizar las regiones cerebrales que expresan el mutante HA- β Nrx1 Δ C, obtuvimos lisados a partir de diferentes estructuras cerebrales de ratones adultos para ser analizados mediante *western blot*. Seleccionamos regiones del prosencéfalo (corteza, estriado, hipocampo) como posibles dianas del promotor CaMKII y externas para controlar su especificidad (cerebelo).

Mediante el uso del anticuerpo que detecta la etiqueta HA, sólo presente en la proteína transgénica, observamos una banda de peso molecular de 48kDa en los carriles correspondientes a lisados de corteza y estriado de animales dobles transgénicos y no de controles (Figura 20). Dicho peso molecular coincide con el observado en experimentos previos de biotilización *in vitro*, indicando la correspondencia con formas maduras de la proteína HA- β Nrx1 Δ C en membrana (Figura 13). La expresión de HA- β Nrx1 Δ C se observó más intensa en las muestras de estriado que en las corticales y se detectó una leve banda a esta altura en los lisados

de hipocampo de ratones β Nrx1 Δ C. En cambio, no observamos expresión de HA- β Nrx1 Δ C en muestras de cerebelo.

Para comparar los niveles de expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C con la proteína β Nrxn1 endógena, utilizamos un anticuerpo anti- β Nrxn1, cuya especificidad primero verificamos *in vitro*. Como vemos en la figura 21, el anticuerpo utilizado reconoce β Nrxn1 pero no otras isoformas de α Nrxns y β Nrxns sobreexpresadas en células HEK293T. Utilizando este anticuerpo en lisados de ratones β Nrx1 Δ C observamos una banda correspondiente al mutante HA- β Nrx1 Δ C de peso molecular equivalente a la observada con el anticuerpo anti-HA (48KDa) en lisados de estriado y corteza (figura 20). Además, este anticuerpo reconoció β Nrxn1 endógena (54KDa) en lisados de ratones control y β Nrx1 Δ C. La diferencia de peso molecular observado entre la proteína β Nrxn1 endógena y la transgénica (6kDa) corresponde con la esperada por la delección del dominio citoplásmico. Por otra parte, la diferencia de 11-12kDa entre el peso molecular esperado según la secuencia aminoacídica y el detectado por *western blot* es el mismo para la proteína β Nrxn1 endógena y la transgénica, indicando una glicosilación similar en ambos casos. Estos datos apoyan que la ausencia del dominio citoplásmico no altera el tránsito correcto de la proteína mutante HA- β Nrx1 Δ C *in vivo*.

Para analizar los niveles de sobreexpresión de la proteína transgénica cuantificamos la señal detectada con el anticuerpo anti- β Nrxn1 en cada estructura cerebral y obtuvimos que, con respecto a la expresión de la proteína endógena, los niveles de HA- β Nrx1 Δ C representan un 85.21%, 183.4% y 53.06% en corteza, estriado e hipocampo, respectivamente (Figura 20 B). Por otra parte, observamos que los niveles de β Nrxn1 endógena no cambian entre los dos grupos de animales (Figura 20 C).

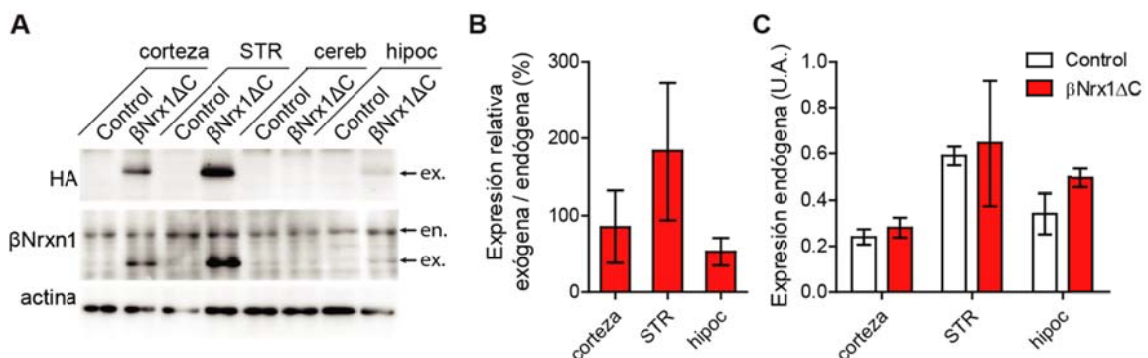


Figura 20. Expresión de HA- β Nrx1 Δ C en diferentes regiones cerebrales. A.- *Western blot* de lisados de corteza, estriado (STR), cerebelo (cereb) e hipocampo (hipoc) testados con el anticuerpo anti-HA y anti- β Nrxn1. Las flechas de la derecha indican las bandas correspondientes al peso molecular de la proteína endógena (en.) y exógena (ex.). B.- Cuantificación de la expresión de HA- β Nrx1 Δ C con respecto a β Nrxn1 endógena detectadas con el anticuerpo anti- β Nrx1 en los lisados de ratones dobles transgénicos. C.- Cuantificación de la expresión de β Nrxn1 endógena normalizada a actina en lisados de ratones control y dobles transgénicos. B y C representan el promedio de tres experimentos realizados con lisados independientes. Todas las barras de error son SEM.

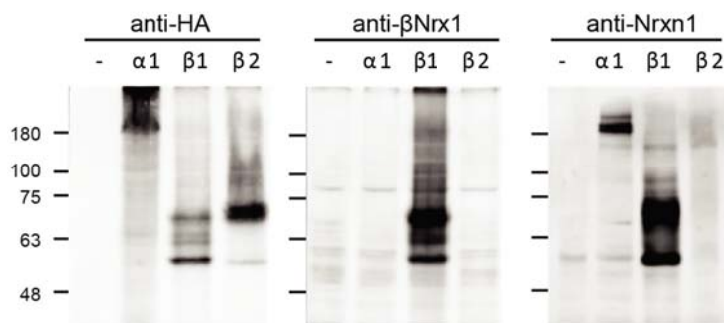


Figura 21. Caracterización de la especificidad del anticuerpo anti- β Nrxn1. Lisados de células HE293T transfectadas con construcciones de α Nrxn1 (α 1), β Nrxn1 (β 1) o β Nrxn2 (β 2) etiquetadas con HA se analizaron con los anticuerpos indicados en la parte superior de cada *western blot*. A la izquierda se indican los pesos moleculares de referencia.

El patrón de expresión de HA- β Nrx1 Δ C se analizó por inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-HA. Observamos que no existe escape de la expresión del transgén en el ratón simple transgénico TRE-HA- β Nrx1 Δ C (Figura 2). La tinción con anti-HA en tejido de ratones β Nrx1 Δ C nos permitió detectar somas positivos en diferentes zonas del prosencéfalo, como las regiones más dorsales de la corteza (corteza cingulada, somatosensorial primaria, motora) y estriado, pero no en otras estructuras del prosencéfalo, como el hipocampo (Figura 22). La tinción en somas coincide con la presencia de un reservorio intracelular de Nrxns endógenas (Dean et al., 2003). El hecho de haber detectado una leve expresión por *western blot* en hipocampo pero no de somas por inmunohistoquímica podría indicar que la expresión de HA- β Nrx1 Δ C provenga de axones que inervan el hipocampo.

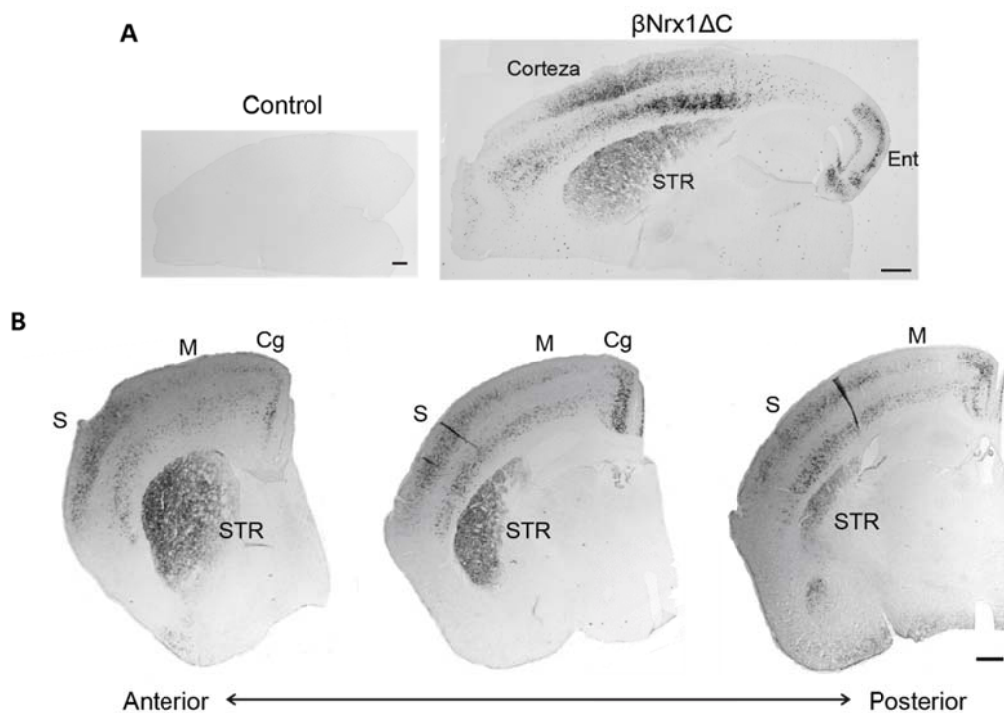


Figura 22. Expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C mediante inmunohistoquímica. A.- Corte en el plano horizontal. Se muestra un control simple transgénico TRE-HA- β Nrx1 Δ C como control negativo del escape de la expresión. B.- Expresión en cortes coronales. Se muestran cortes en tres puntos del eje antero-posterior. STR: estriado; S: corteza somatosensorial; M: corteza motora; Cg: corteza cingulada; Ent: corteza entorrinal. Escala de tamaño: 500 μ m. Experimento realizado por el Dr. Luis García Rabaneda.

El experimento de inmunohistoquímica nos permitió además conocer la regionalización de las neuronas positivas dentro de cada estructura. En la corteza observamos que el mutante HA- β Nrx1 Δ C se concentra en neuronas de las capas 2/3 y 5/6 (Figura 23). Como se puede apreciar en la magnificación de la figura 23 A, la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C se detectó en las proyecciones de las neuronas corticales, representando un indicio de expresión sináptica. Mediante inmunofluorescencia combinada de HA y NeuN detectamos que alrededor del 30% de las neuronas identificadas como NeuN positivas en la capa 5/6 de la corteza somatosensorial expresaban HA- β Nrx1 Δ C (datos no mostrados). Además, observamos que las neuronas positivas para HA no eran positivas para parvalbumina (PV) (Figura 23 B). Debido a que las neuronas que expresan PV constituyen el grupo mayoritario de

interneuronas corticales (Rudy et al., 2011), estos resultados sugieren que la proteína transgénica se expresa en neuronas piramidales glutamatérgicas, que concuerda con la actividad del promotor CaMKII en las neuronas principales de la corteza. Por ello, la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C en neuronas glutamatérgicas coincide con la expresión preferente de isoformas de Nrxns1 AS4- en el mismo tipo celular (Fuccillo et al., 2015).

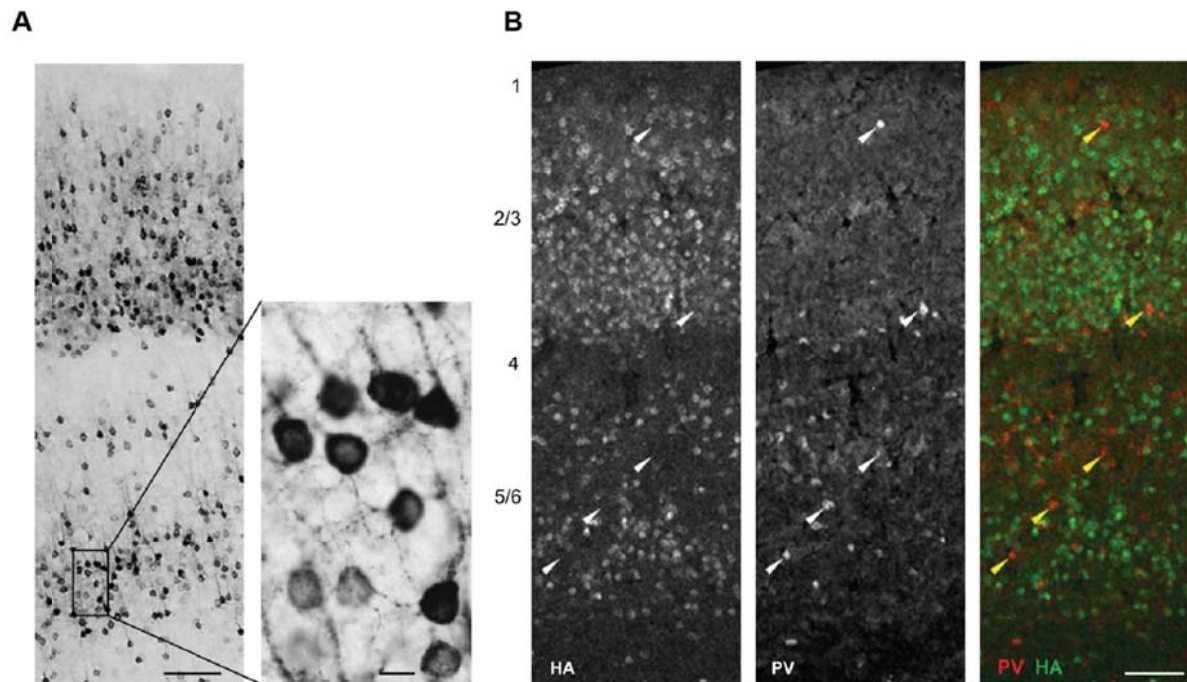


Figura 23. Expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C en corteza. A.- Inmunohistoquímica que muestra la expresión de HA en las neuronas de las capas 2/3 y 5/6 de la corteza somatosensorial. En la magnificación se muestra la tinción en las proyecciones de estas neuronas. B.- Inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-HA y anti-PV. Las células HA no muestran señal PV, como señalan las flechas. Escalas de tamaño: 100 μ m en panel izquierdo de A y B; 10 μ m en la magnificación de A. Experimento realizado por el Dr. Luis García Rabaneda.

El patrón temporal de la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C se analizó mediante *western blot* en lisados de corteza a diferentes días postnatales. En este experimento observamos que la expresión de la proteína transgénica HA- β Nrx1 Δ C se inicia a partir de la tercera semana postnatal, alcanzando su máximo nivel a los 45 días de edad y manteniéndose durante la etapa adulta (Figura 24). Este patrón temporal de expresión

postnatal permite que la función de Nrns no se vea perturbada durante las primeras dos semanas postnatales, cuando tiene lugar una abundante formación de sinapsis.

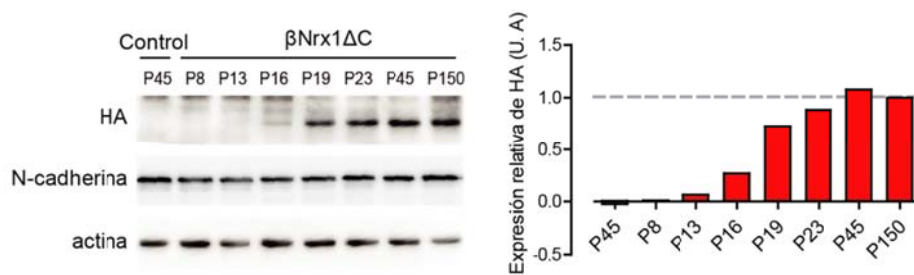


Figura 24. Expresión postnatal de la proteína HA-βNrx1ΔC analizada con el anticuerpo anti-HA mediante *western blot*. Se comparan lisados de corteza de ratones tomados en los puntos postnatales indicados en la parte superior de cada carril. Se muestra también la expresión de N-cadherina y actina como control. A la derecha se representa la cuantificación de la detección de HA-βNrx1ΔC relativa al último punto postnatal analizado.

1.2. Control temporal de la expresión de HA-βNrx1ΔC con Dox

Una de las ventajas de la línea βNrx1ΔC es que utiliza el sistema Tet-off, que permite apagar la expresión del transgén con tetraciclina o su derivado Dox. Para verificar y caracterizar la inhibición de la expresión en nuestro modelo administramos Dox a ratones adultos βNrx1ΔC. La vía escogida para administrar el fármaco fue la dieta, ya que permite un tratamiento continuado sin manipular ni estresar a los animales. El experimento se realizó con dos dosis de Dox diferentes en la composición de la dieta (una dosis estándar de 40mg/kg y otra de 625mg/kg) y con tratamientos de diferente duración (3, 7 y 11 días) para caracterizar la cinética del apagado. Se analizaron lisados de corteza y estriado por *western blot* con el anticuerpo anti-HA. Como se puede ver en la figura 25, a los cuatro días de tratamiento ambas dosis de Dox causaron un descenso de la expresión de la proteína exógena en ambas estructuras cerebrales y la bloquearon completamente a partir del séptimo día de tratamiento.

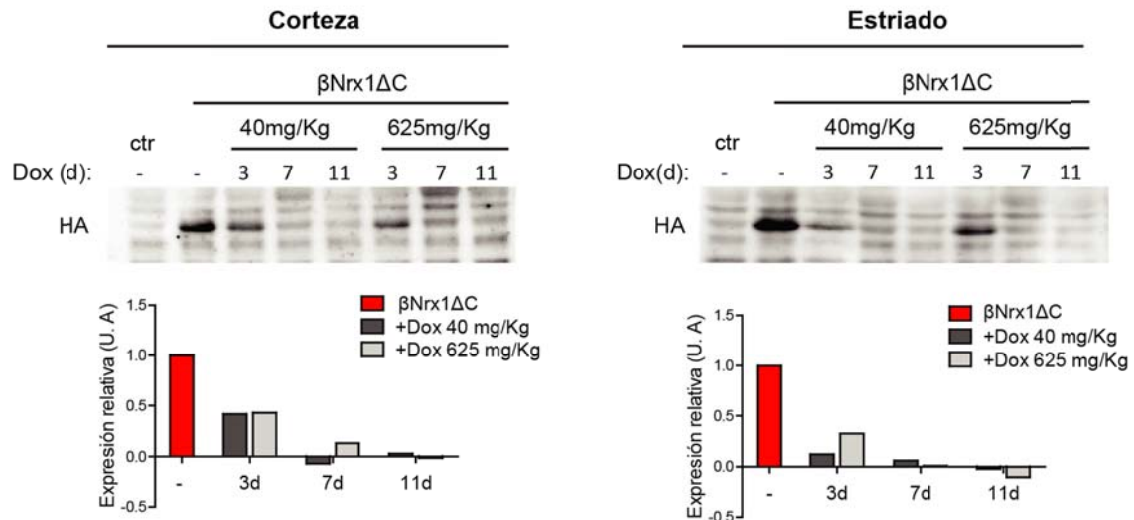


Figura 25. Caracterización del apagado de la expresión del transgén con Dox en ratones adultos. Se analiza la inhibición de la expresión de HA-βNrx1ΔC en corteza y estriado de ratones βNrx1ΔC utilizando dos dosis de Dox en la dieta (40mg/Kg y 625mg/Kg) durante 3, 7 y 11 días de tratamiento. Se utilizan muestras de ratones βNrx1ΔC y control (ctr) no tratados como control positivo y negativo de la expresión, respectivamente. En la parte inferior se representa la cuantificación de HA-βNrx1ΔC en las muestras de ratones βNrx1ΔC no tratados y tratados en las diferentes condiciones de dosis y duración.

Una vez confirmado el apagado del transgén con Dox, nos pareció interesante conocer si la expresión de la proteína transgénica HA-βNrx1ΔC se puede recuperar al retirar la dieta con Dox, o si por el contrario el apagado del transgén es permanente aunque se suspenda el tratamiento. Para averiguarlo tratamos ratones control y βNrx1ΔC con dieta con Dox desde el momento del nacimiento hasta los tres meses de edad y posteriormente les retiramos el tratamiento durante dos meses (Dox on/off). Como podemos ver en la figura 26, los ratones dobles transgénicos no recuperaron la expresión del mutante HA-βNrx1ΔC.

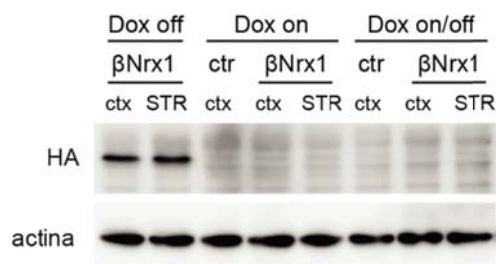


Figura 26. Análisis de la expresión de HA- β Nrx1 Δ C al retirar Dox tras 3 meses de tratamiento. La expresión en corteza (ctx) y estriado (STR) se analiza por *western blot* con el anticuerpo anti-HA. Se comparan muestras de ratones β Nrx1 Δ C de tres grupos: sin tratamiento (Dox off), tratados con Dox (Dox on) y tratados durante los tres primeros meses de vida con Dox (625mg/Kg) y posteriormente mantenidos en dieta sin Dox durante 65 días (Dox on/off). Se utilizan muestras corticales de ratones control (ctr) como control negativo de la expresión.

Para testar si la falta de re-expresión del transgén podría deberse a la larga duración y/o al momento del tratamiento, decidimos realizar otro experimento en ratones adultos acortando a dos semanas la dieta con Dox. Tras este tiempo reemplazamos el fármaco por dieta normal durante 14 o 34 días. Como se puede apreciar en la figura 27, la expresión de la proteína transgénica en corteza de los ratones Dox on/off se restablece a un nivel comparable al de animales dobles transgénicos sin tratamiento (off). Sin embargo, en lisados del estriado la re-expresión no alcanza los niveles iniciales de ratones β Nrx1 Δ C sin tratamiento.

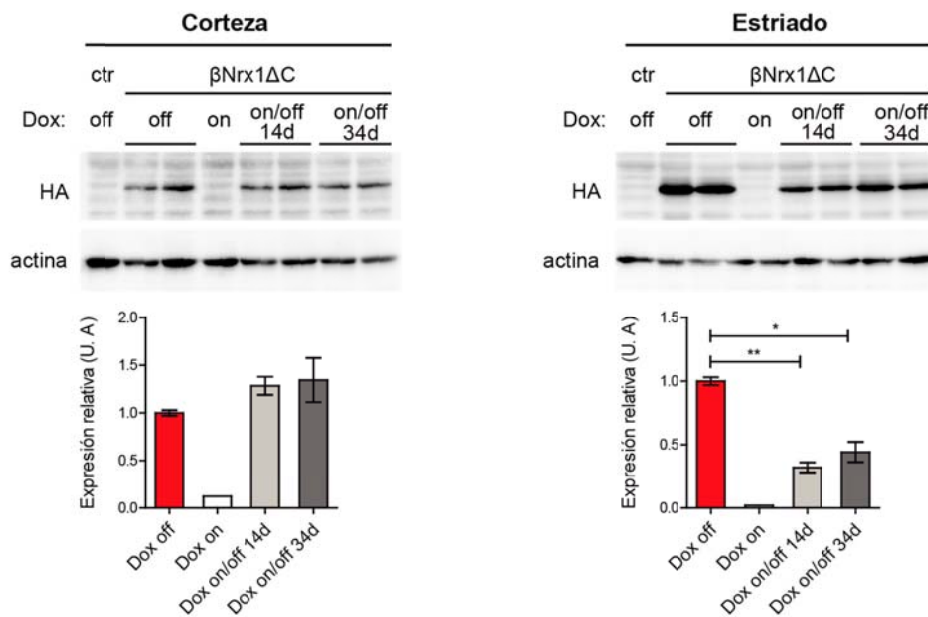


Figura 27. Análisis de la expresión de HA- β Nrx1 Δ C al retirar Dox tras 14 días de tratamiento. Se analiza la expresión en corteza y estriado mediante *western blot* con el anticuerpo anti-HA. Se comparan muestras de ratones β Nrx1 Δ C de cuatro grupos: sin tratamiento (Dox off), en tratamiento con Dox (40mg/Kg) (Dox on), tratados durante 14 días con Dox y posteriormente mantenidos en dieta sin Dox durante 14 días (Dox on/off 14d) y tratados durante 14 días con

Dox y posteriormente mantenidos en dieta sin Dox durante 34 días (Dox on/off 34d). Se utilizan muestras de ratones control (ctr) como control negativo de la expresión. En la parte inferior se muestran las gráficas de la cuantificación de la expresión de HA- β Nrx1 Δ C normalizada a actina en los cuatro grupos de ratones β Nrx1 Δ C. N=2 (Dox off, Dox on/off 14d, Dox on/off 34d); N=1(Dox on). Análisis estadístico (sólo aplicable en las muestras con N=2): *one-way* ANOVA, *posthoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples. **p-value* < 0.05; ***p-value* < 0.01. Todas las barras de error son SEM.

Por este motivo, para todos los experimentos de este trabajo que requieren el apagado de la expresión de la proteína transgénica, los animales se trataron con Dox de manera continuada durante un mínimo de dos semanas y hasta el fin del experimento. Por otra parte, el hecho de que el mutante sea capaz de re-expresarse nos permite inducir en el momento que deseemos la expresión del dominante negativo HA- β Nrx1 Δ C tras el apagado del transgén.

1.3. Expresión sináptica del mutante HA- β Nrx1 Δ C

Las Nrxns participan en la formación y función sináptica a través de un mecanismo presináptico (Dean et al., 2003; Markus Missler et al., 2003). Sin embargo, también se ha propuesto un rol adicional de las Nrxns en el terminal postsináptico, donde pueden participar en la inhibición de la función de NL mediante interacciones en *cis* (Taniguchi et al., 2007). Los experimentos *in vitro* previos apoyan a un papel presináptico del mutante HA- β Nrx1 Δ C, ya que puede mediar contactos transsinápticos a través del dominio extracelular pero reduce la probabilidad de liberación por carecer del dominio citoplásmico (Figura 15). Por tanto, consideramos relevante abordar la localización subcelular del mutante HA- β Nrx1 Δ C *in vivo*. La localización sináptica del mutante HA- β Nrx1 Δ C se podría abordar mediante experimentos de inmunolocalización en microscopía electrónica. Sin embargo, la presencia de la etiqueta HA en el extremo N-terminal situaría la posible tinción en la hendidura sináptica, sin capacidad de distinguir la distribución pre- o postsináptica. Por ello, para aclarar esta cuestión decidimos aplicar un protocolo de fraccionamiento subcelular consecutivo. Este proceso consiste en la purificación de los terminales nerviosos (sinaptosomas) por

técnicas bioquímicas. A partir de ellos podemos separar los componentes del terminal presináptico y postsináptico. Analizamos por *western blot* las diferentes fracciones obtenidas de corteza, normalizadas por igual cantidad de proteína. El enriquecimiento de VGlut1 y de PSD-95 en el terminal presináptico y postsináptico, respectivamente, confirmó la correcta separación de los dos terminales (Figura 28). Utilizando el anticuerpo anti-HA, observamos un claro enriquecimiento de la proteína transgénica HA- β Nrx1 Δ C en la fracción presináptica comparado con la postsináptica ($76.15\% \pm 4.439$ N=5) (figura 28). La localización presináptica de HA- β Nrx1 Δ C indica que la expresión del dominante negativo de β Nrxn1 se produce en el mismo compartimento donde las Nrxns endógenas realizan funciones necesarias para el correcto funcionamiento de la sinapsis.

Hemos demostrado que el tratamiento Dox apaga la expresión de HA- β Nrx1 Δ C en lisados totales (figura 28). Sin embargo, debido a la localización en sinapsis del mutante, donde la vida media de la proteína podría ser diferente, quisimos confirmar si la dieta con Dox suprime la expresión de HA- β Nrx1 Δ C también a nivel sináptico. Para ello, realizamos un fraccionamiento de sinaptosomas en lisados corticales de ratones que habíamos mantenido con dieta Dox durante dos semanas. Como se puede observar en la figura 28, la detección de la proteína transgénica en sinaptosomas desaparece por completo en los terminales sinápticos al apagar el transgén, en concordancia con el análisis previo de lisados totales. En este experimento analizamos también los niveles de las proteínas VGlut1 y VGAT como marcadores sinápticos glutamatérgicos y GABAérgicos respectivamente, sin encontrar alteraciones ocasionadas por la expresión de HA- β Nrx1 Δ C.

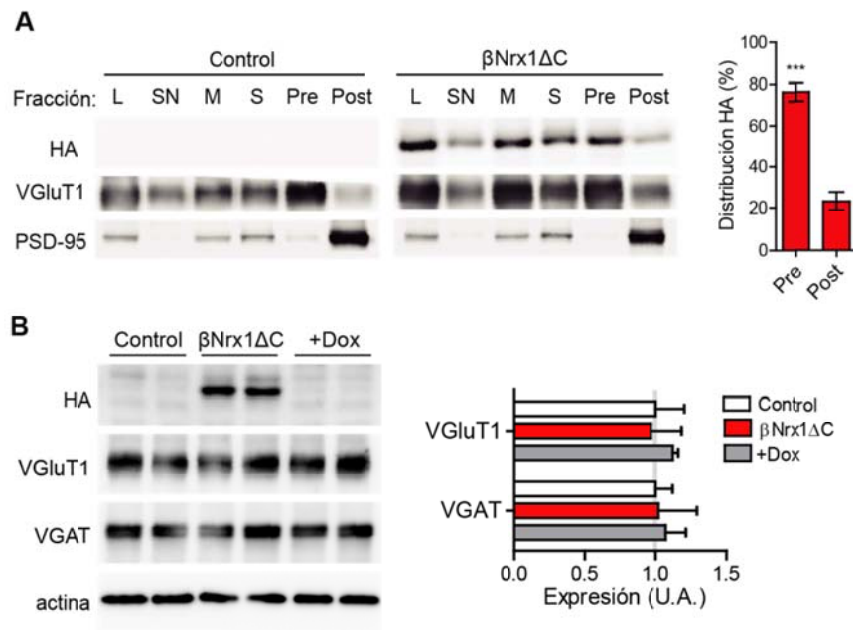


Figura 28. Localización presináptica y regulable con Dox de HA-βNrx1ΔC *in vivo*. A.- Fraccionamiento subcelular de sinaptosomas y análisis de HA-βNrx1ΔC por *western blot* con el anticuerpo anti-HA. Se muestran VGLuT1 y PSD-95 como marcadores de la fracción presináptica y postsináptica, respectivamente. Las fracciones analizadas son: L- lisado total, SN- material descartado, M- fracción de membrana, S- fracción de sinaptosomas, Pre- enriquecimiento presináptico y Post- enriquecimiento postsináptico. A la derecha se muestra la cuantificación de la detección de HA-βNrx1ΔC en la fracción presináptica y postsináptica con respecto a la suma de ambas. Se representa el promedio de 5 fraccionamientos independientes. B.- Apagado de la expresión del transgén HA-βNrx1ΔC en preparaciones de sinaptosomas tras el tratamiento con Dox. Se analizan dos extracciones independientes de cada condición con los anticuerpos anti-HA, anti-VGLuT1 y anti-VGAT. A la derecha se muestra la cuantificación de la detección de VGLuT1 y VGAT. Test estadístico aplicado *t-test* (A), *one-way ANOVA* (B). *** *P-value* <0,001. Todas las barras de error son SEM.

La caracterización de la expresión de HA-βNrx1ΔC *in vivo* nos lleva a concluir que la proteína transgénica se expresa postnatalmente y de manera reversible con el tratamiento con Dox en el terminal presináptico de las neuronas principales de la corteza y, posiblemente, del estriado. Por lo tanto, los defectos que deriven de dicha expresión afectarán a mecanismos presinápticos de circuitos postnatales concretos.

1.4. Registro electrofisiológico de las corrientes postsinápticas espontáneas en miniatura en rodajas de cerebro

Como hemos mostrado anteriormente, experimentos realizados en nuestro laboratorio demuestran que la expresión del mutante de HA- β Nrx1 Δ C en cultivos neuronales produce un descenso en la liberación vesicular comparado con neuronas control o con neuronas que sobre-expresan HA- β Nrx1 (Figura 15). Sin embargo, la expresión del mutante no produjo defectos en el reclutamiento de marcadores de vesículas sinápticas *in vitro* ni *in vivo* (Figura 14, 28).

Para analizar las consecuencias funcionales *in vivo* de la expresión de HA- β Nrx1 Δ C realizamos registros electrofisiológicos de célula completa en rodajas de cerebro de ratones β Nrx1 Δ C. El experimento se llevó a cabo en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Rafael Fernández Chacón en el IBiS y lo efectuó el Dr. José Luis Nieto.

Se registraron en presencia de tetrodoxina (TTX) las corrientes postsinápticas espontáneas en miniatura excitatorias (mEPSCs) e inhibitorias (mIPSCs) en tres ratones control y β Nrx1 Δ C de un mes. Seleccionamos para ello las neuronas piramidales de las capas 5-6 de la corteza somatosensorial, donde habíamos observado una elevada expresión del mutante de β Nrxn1 (Figura 22,23). Estos experimentos mostraron que la amplitud media de mEPSCs no se veía afectada en las neuronas corticales del ratón β Nrx1 Δ C, lo que sugiere que no está alterada la cantidad de neurotransmisor liberada por vesícula sináptica ni la maquinaria postsináptica. Sin embargo, encontramos una reducción del 50% en la frecuencia de mEPSCs en las neuronas corticales de ratones β Nrx1 Δ C (Figura 29 A). Estos datos apoyan que la reducción de la transmisión glutamatérgica se debe a mecanismos presinápticos mediados por la expresión del mutante en estos terminales, que bien reducen la probabilidad de liberación o el número de terminales activos. Con respecto a la transmisión sináptica inhibitoria, no se observó alteración en la amplitud media de mIPSCs, aunque observamos una reducción menor (30%) en la frecuencia de mIPSCs en neuronas corticales de ratones β Nrx1 Δ C (Figura 29 B). Debido a que las interneuronas corticales no expresan el transgén HA- β Nrx1 Δ C (Figura 23), la reducción en la frecuencia de mIPSCs podría

indicar un mecanismo compensatorio de regulación debido a una reducción crónica de la actividad excitatoria (Lau et al., 2012).

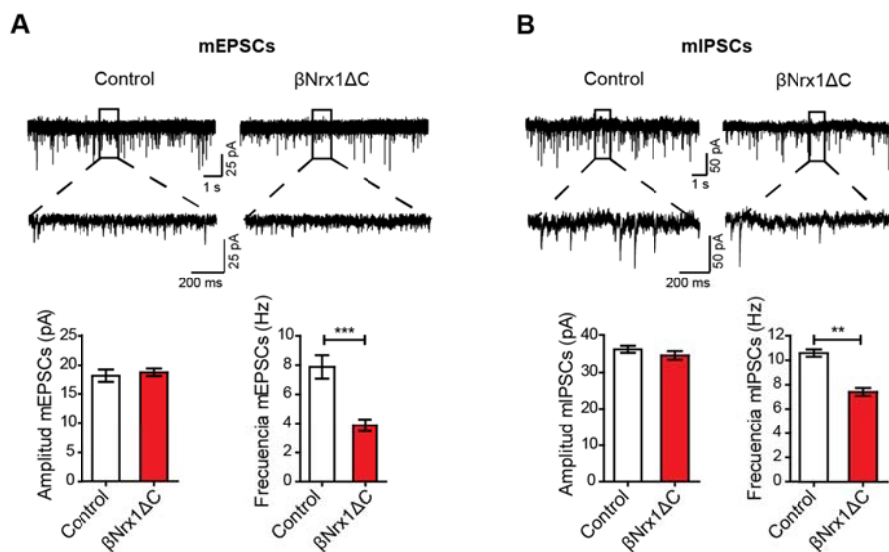


Figura 29. Registro de las corrientes postsinápticas en miniatura. A.- Trazos representativos de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas en miniatura (mEPSCs) y la cuantificación de su amplitud y frecuencia. B.- Trazos representativos de las corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura (mIPSCs) y la cuantificación de su amplitud y frecuencia. Controles: 3 animales, 9 neuronas registradas; β Nrx1 Δ C: 3 animales, 8 neuronas registradas.

Estos resultados electrofisiológicos concuerdan con el descenso en liberación vesicular observado *in vitro* y demuestran una validación funcional *in vivo* de la manipulación genética empleada, la expresión postnatal del mutante HA- β Nrx1 Δ C con efecto dominante negativo.

2. Caracterización fenotípica del comportamiento del ratón β Nrx1 Δ C

Como hemos explicado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, el diagnóstico de los pacientes con TEA se basa en las características de sus patrones de comportamiento. El último manual DSM-5 (APA, 2013) recoge los siguientes criterios diagnósticos:

- Patrones repetitivos y restringidos de conductas, actividades e intereses
- Déficits persistentes en comunicación social e interacción social

Para analizar si la disfunción postnatal de β Nrxns conlleva defectos asociados al TEA decidimos realizar un análisis de las características del comportamiento de los ratones β Nrx1 Δ C.

Para todos los experimentos de comportamiento se utilizaron como control los hermanos de camada *wild-type* o simples transgénicos TRE-HA- β Nrx1 Δ C, que como ya hemos demostrado no presentan escape de la expresión del transgén (Figura 22).

Las pruebas de comportamiento, la extracción de los datos y el análisis estadístico de los resultados desarrollados a continuación se realizaron por dos investigadores: Luis García Rabaneda (LGR) y la autora de esta tesis, Estefanía Robles Lanuza (ERL). En ambos casos, los investigadores desconocíamos el genotipo de los ratones analizados hasta la obtención final de los resultados.

2.1. Evaluación general del estado del animal

Para descartar problemas generales en el modelo β Nrx1 Δ C realizamos una primera evaluación general del estado del animal. Los ratones β Nrx1 Δ C no presentaron diferencias observables en su aspecto general ni en la morfología general del cerebro (datos no mostrados). Así mismo, no observamos cambios en la frecuencia mendeliana de nacimientos, que pudiera reflejar una mortalidad prenatal, ni en esperanza de vida media o en peso con respecto a sus hermanos de camada (Figura 30). Para evaluar las funciones sensoriales autonómicas y musculares del ratón doble transgénico β Nrx1 Δ C se realizaron una batería de pruebas primarias SHIRPA (Rogers et al., 1997) recogidas

en la tabla 3 del apartado Materiales y Métodos. En este análisis no se detectaron problemas asociados a los ratones control o β Nrx1 Δ C. Las pruebas de análisis general SHIRPA se repitieron posteriormente en todas las poblaciones participantes como un paso previo a los ensayos de comportamiento, obteniéndose resultados similares.

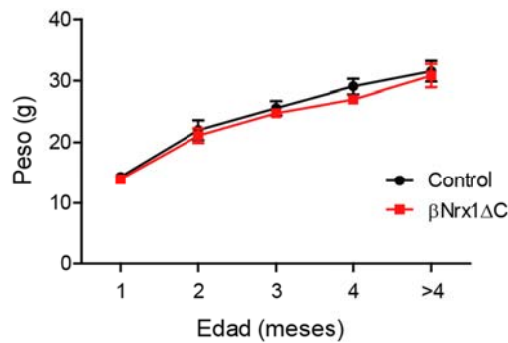


Figura 30. Evolución del peso de los animales control y β Nrx1 Δ C durante los primeros meses de vida. N=3-7 ratones control; N= 2-10 ratones β Nrx1 Δ C.

2.2. Análisis de la locomoción exploratoria. Test de campo abierto

En las tres pruebas de comportamiento que desarrollamos a continuación (test de campo abierto, *rotarod* y test de reconocimiento de objetos) utilizamos una población común de 13 ratones control (6 ratones *wild-type* y 7 simples transgénicos TRE-HA- β Nrx1 Δ C) y 10 ratones β Nrx1 Δ C machos de 5-7 meses.

Primero evaluamos la locomoción exploratoria con el test de campo abierto. En esta prueba, el ratón a analizar se sitúa en una caja vacía de grandes dimensiones (45x 45cm) y se evalúa la distancia total recorrida y el tiempo que pasa en el centro del área (15 x 15cm) como medidas de la locomoción general y de ansiedad, respectivamente (Figura 31). Debido a que los espacios abiertos generan inseguridad en los roedores, los ratones con más ansiedad evitan el centro del campo abierto. En este test observamos igual distancia total recorrida entre los ratones control y β Nrx1 Δ C y un tiempo similar de estancia en el centro en ambos grupos (Figura 31).

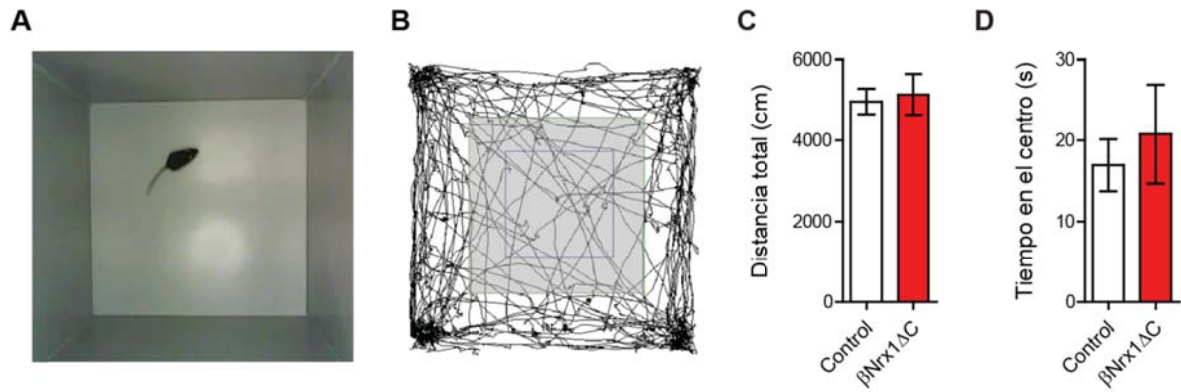


Figura 31. Prueba de campo abierto. A.- Visión aérea del test. B.- Ejemplo de análisis del recorrido de un animal en el campo abierto (45x45cm) con el software Viewer 3 (Bioobserve) utilizado para las cuantificaciones de distancia recorrida y tiempo en el área central (15x15cm), sombreada en la imagen. C.- Distancia total recorrida. D.-Tiempo acumulado en el área central. N=13 ratones control; N=10 ratones β Nrx1 Δ C. Edad: 5-7 meses. Análisis estadístico utilizado: *t*-test. Todas las barras de error son SEM. Realización del test: LGR. Análisis: ERL.

2.3. Evaluación de la capacidad de locomoción forzada y aprendizaje motor.

Prueba de *rotarod*

En el test de *rotarod* se coloca al ratón sobre un eje que gira y acelera progresivamente en el tiempo y se mide el tiempo que el animal consigue caminar sobre él sin caerse (Figura 32). Mediante la cuantificación de la latencia de caída, este test evalúa la locomoción forzada y el aprendizaje motor a lo largo de cuatro días con dos sesiones diarias. Para el análisis se utilizó la sesión con mayor tiempo de latencia de cada día de entrenamiento. Los ratones β Nrx1 Δ C mostraron un aprendizaje motor similar al del control, mostrando un incremento similar en la latencia de caída entre el primer y cuarto día de entrenamiento (Figura 32). Además, ambos grupos presentaron valores similares de latencia de caída en cada sesión.

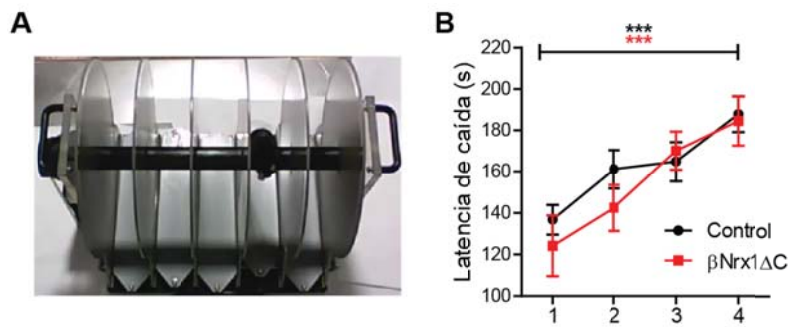


Figura 32. Prueba de rotarod. A.-Fotografía del aparato utilizado. El ratón se encuentra caminando sobre el eje que gira. B.- Resultados de la prueba. Se representa el mayor tiempo de latencia de caída de dos sesiones diarias durante cuatro días de entrenamiento (eje de abscisas). N=13 ratones control; N=10 ratones β Nrx1 Δ C. Edad: 5-7 meses. Análisis estadístico utilizado: *two-way* ANOVA con medidas repetidas y *post hoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples. ****p-value* < 0.001. Todas las barras de error son SEM. Realización y análisis del test: LGR.

2.4. Evaluación de la memoria de reconocimiento

El test de reconocimiento de objetos evalúa la memoria de reconocimiento a largo plazo (24 horas) gracias a la preferencia por la novedad innata de los roedores y sin necesidad de componentes estresantes o aversivos (Vogel-Ciernia et al., 2014). En esta prueba se le presentan al ratón dos objetos idénticos en una caja durante 10 minutos. A las 24 horas se reemplaza uno de los objetos conocidos por un objeto nuevo y se cuantifica el tiempo que el ratón interactúa con cada uno de ellos durante 5 minutos (Figura 33). La memoria de reconocimiento por el objeto familiar se relaciona con una menor interacción con él y por ello un mayor porcentaje de interacción con el objeto nuevo (índice de memoria).

Los grupos control y β Nrx1 Δ C presentaron un porcentaje similar de interacción preferencial por el objeto nuevo (Figura 33 B). Sin embargo, sí observamos una diferencia entre los dos genotipos no relacionada con memoria, sino posiblemente con un comportamiento persistente. Los ratones β Nrx1 Δ C incrementaron al doble el tiempo total de interacción con los dos objetos comparado con los ratones control (Figura 33 C).

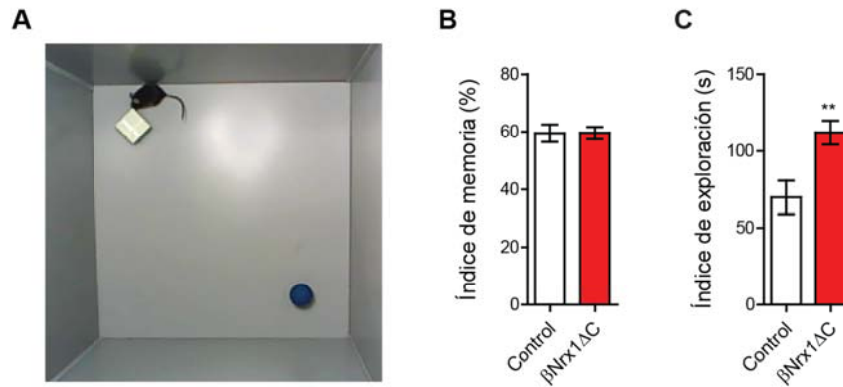


Figura 33. Prueba de memoria de reconocimiento de objetos. A.- Visión aérea del test durante la fase de presentación de un objeto nuevo y otro familiar. B.- Índice de memoria a las 24 horas. C.- Índice de exploración. Suma de la interacción total con los dos objetos. N=13 ratones control; N=10 ratones β Nrx1ΔC. Edad: 5-7 meses. Análisis estadístico utilizado: *t-test*. ***p-value* < 0.01. Todas las barras de error son SEM. Realización y análisis del test: LGR.

2.5. Caracterización del comportamiento relacionado con autismo en ratones machos

Los resultados de comportamiento anteriormente presentados mostraron que la disfunción de β Nrxns no afecta al comportamiento general. A continuación, pasamos a analizar los componentes del comportamiento relacionado con los síntomas del TEA, es decir, patrones repetitivos y restringidos de conductas y déficits persistentes en interacción social y comunicación social (APA, 2013). Para ello, utilizamos pruebas comportamentales diseñadas específicamente para estudiar este tipo de conductas, como son las pruebas de acicalamiento o *self-grooming* repetitivo, el test de interacción social en el *3-chamber* test y la prueba de habituación y deshabituación de la olfacción (Pasciuto et al., 2015; Crawley, 2012; Silverman et al., 2010). Este tipo de ensayos tan específicos de evaluación del comportamiento repetitivo y social no habían sido realizados anteriormente en nuestro grupo, por lo que tuvimos que implementar el material y poner a punto el diseño y análisis de los experimentos. Estas pruebas comportamentales se realizaron en una cohorte de 9 ratones control (3 *wild-type* y 6 simples transgénicos TRE-HA- β Nrx1ΔC) y 9 ratones β Nrx1ΔC, todos machos y de edades comprendidas entre dos y cuatro meses.

2.5.1 Análisis del comportamiento repetitivo con el *self-grooming* test

En el test del acicalamiento o *self-grooming* se cuantifica el tiempo que los ratones pasan realizando secuencias estereotipadas de acicalamiento (Figura 34), así como el número de eventos que inician durante 10 minutos. Un incremento de *self-grooming* denota un comportamiento repetitivo del ratón.

El grupo β Nrx1 Δ C presentó un incremento tanto en tiempo como en número de eventos de acicalamiento, que duplicaron los valores observados en los ratones control (Figura 34). Sin embargo, este incremento no afectó al tiempo medio por evento de *self-grooming*, por lo que los resultados anteriores muestran una mayor frecuencia de eventos sin cambios en la duración de los mismos.

El incremento en comportamiento repetitivo de acicalamiento de los ratones β Nrx1 Δ C podría asociarse al comportamiento de persistencia observado en el experimento de reconocimiento de objetos, en el que mostraban una interacción exagerada con los dos objetos.

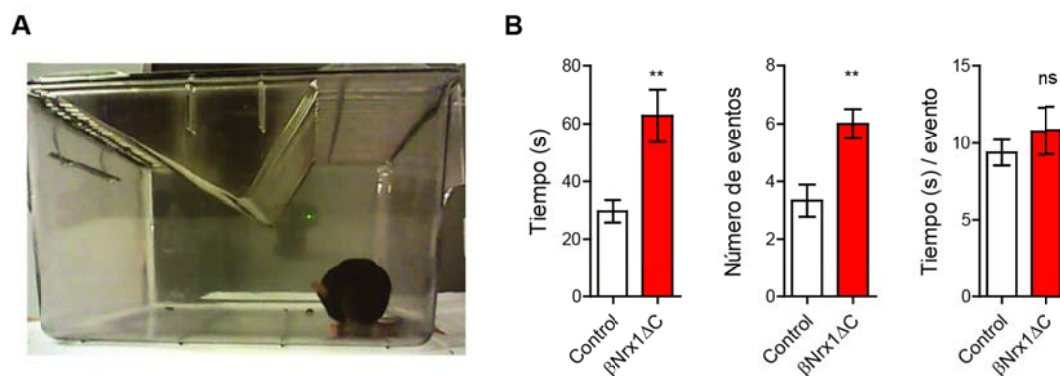


Figura 34. Test de acicalamiento o *self-grooming*. A.- Foto del test. B.- Cuantificaciones realizadas. De izquierda a derecha, tiempo de acicalamiento, número de eventos de *self-grooming* y tiempo promedio de la duración de un evento de acicalamiento (segundos). N=9 ratones control; N=9 ratones β Nrx1 Δ C. Edad: 2-4 meses. Análisis estadístico utilizado: *t*-test. ***p*-value < 0.01. Todas las barras de error son SEM. Realización y análisis del test: LGR.

2.5.2 Análisis de la interacción social con la prueba de sociabilidad 3-chamber

El comportamiento social lo evaluamos con la prueba de sociabilidad 3-chamber. Esta prueba se realiza en una caja subdividida en tres habitaciones, una central y dos laterales, conectadas por puertas a la habitación central (Figura 35). En cada habitación lateral se coloca un cilindro enrejado que contiene el estímulo. El ratón a analizar puede moverse libremente e iniciar la interacción con los estímulos presentados dentro de los cilindros. La prueba se divide en dos fases que se realizan secuencialmente: la fase de preferencia social y la fase de preferencia por la novedad social.

En la fase de preferencia social se evalúa la interacción que el ratón analizado muestra con un ratón de la misma edad y sexo (estímulo social) o con un objeto (estímulo no social). Como era de esperar, los ratones control presentaron mayor tiempo de interacción con el ratón que con el objeto (Figura 35). Sin embargo, comparado con los controles, los ratones β Nrx1 Δ C mostraron un descenso en la interacción con el ratón y un incremento en la interacción con el objeto, que causaron que no mostrara diferencias significativas en el tiempo de interacción con ambos estímulos (Figura 35 C).

En la fase de la preferencia por la novedad social se intercambia el objeto por un ratón no relacionado con el de la fase anterior. Se evalúa el tiempo de interacción con el ratón desconocido (nuevo) y con el ratón común a la fase anterior (familiar). Mientras que los ratones control realizaron una interacción preferencial por el ratón nuevo, los ratones β Nrx1 Δ C disminuyeron la interacción con el ratón nuevo y la incrementaron con el ratón familiar (Figura 35 D). Por lo tanto, los ratones β Nrx1 Δ C mostraron una menor preferencia ante la novedad social.

De manera específica, los déficits en la preferencia y en la novedad sociales observados en el ratón β Nrx1 Δ C no se deben a una diferencia en el tiempo total de interacción o diferencias en el nivel de exploración o locomoción de los ratones, ya que

el tiempo total de interacción, el número de entradas a las habitaciones laterales y la distancia total recorrida es similar entre los ratones control y β Nrx1 Δ C (Figura 35 E).

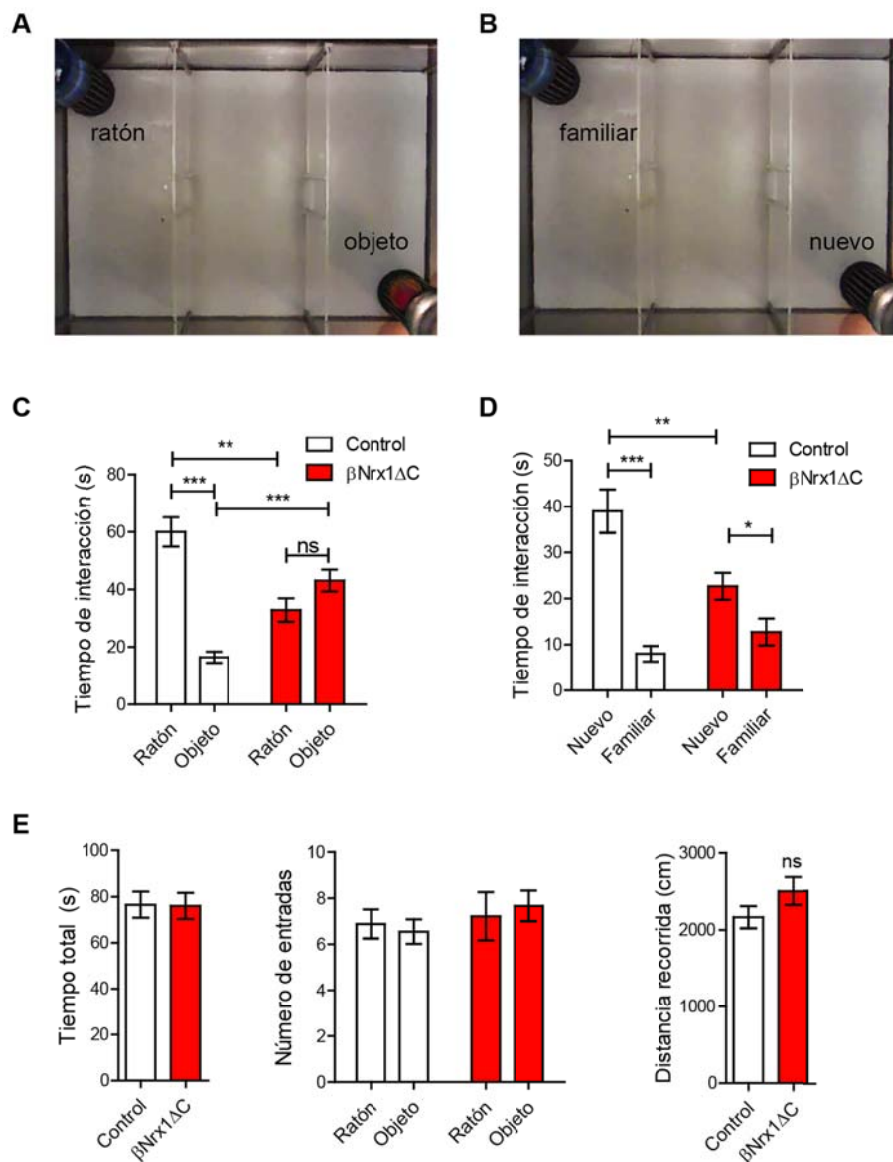


Figura 35. Tiempo de interacción con los estímulos presentados durante el test de sociabilidad *3-chamber*. A, B.- Imagen del aparato *3-chamber* durante la fase de preferencia social (A) y preferencia por la novedad social (B) en la que se indica el contenido del cilindro enrejado. C.- Tiempo de interacción en la fase de preferencia social con el estímulo social (ratón) y no social (objeto). D- Tiempo de interacción en la fase de preferencia por la novedad social con el ratón nuevo y el ratón familiar. E.- De izquierda a derecha, cuantificación del tiempo total de interacción, número de entradas a las habitaciones laterales y distancia total recorrida cuantificadas en la fase de preferencia social. N=9 ratones control; N=9 ratones β Nrx1 Δ C. Edad: 2-4 meses. Análisis estadístico utilizado: *Two-way ANOVA* con medidas repetidas y *post*

hoc de Bonferroni con comparaciones múltiples (C, D y E central); *t-test* (E gráficas laterales). **p-value* < 0.05; ***p-value* < 0.01; ****p-value* < 0.001. Todas las barras de error son SEM. Realización del test: LGR. Análisis de los datos: LGR y ERL.

2.5.3 Análisis de la comunicación social con el test de habituación/deshabituación de la olfacción

Tomando las señales olfativas como base de la comunicación en roedores, realizamos el test de habituación/deshabituación de la olfacción de olores sociales y no sociales (Yang et al., 2009). En este test, se presentan secuencialmente diferentes olores y se cuantifica el tiempo de olfacción que muestran los ratones (Figura 36). Cada olor se presenta con tres repeticiones, comenzando por olores no sociales y finalmente sociales.

Como podemos ver en la figura 36, los ratones control mostraron un incremento en el tiempo de interacción durante la primera presentación de olores sociales (orina A) comparado con la de los no sociales (agua, azahar, vainilla). Sin embargo, los animales β Nrx1 Δ C presentaron una respuesta exagerada frente a estímulos olfativos no sociales, que estaba incrementada al nivel de los estímulos sociales. En ambos grupos, la interacción con la segunda muestra de olor social (orina B) no llegó a ser tan elevada como la primera, tal y como se ha descrito en la literatura (Yang et al., 2009). Por otra parte, ambos grupos mostraron capacidad de discriminar entre las repeticiones del mismo olor, ya que mostraron habituación a la segunda y tercera presentación de cada olor, con un menor tiempo de olfacción que en la exposición previa. La deshabituación, analizada como el tiempo de interacción con un nuevo olor, tampoco se vio afectada en los ratones β Nrx1 Δ C (figura 36).

La interacción aumentada con olores no sociales podría deberse a una menor detección general de olores en el ratón β Nrx1 Δ C. Por ello se evaluó la capacidad de detección de olores mediante la búsqueda de un pellet de comida oculto. Esta prueba se realiza tras privar a los animales de comida durante 24 horas y se cuantifica el tiempo que tardan en encontrar un pellet de pienso enterrado bajo el serrín. En este análisis, los ratones β Nrx1 Δ C y control mostraron igual tiempo de latencia en

encontrar la comida (Figura 36 C), por lo que descartamos que la interacción exagerada con olores no sociales de los ratones β Nrx1 Δ C se deba a problemas de anosmia.

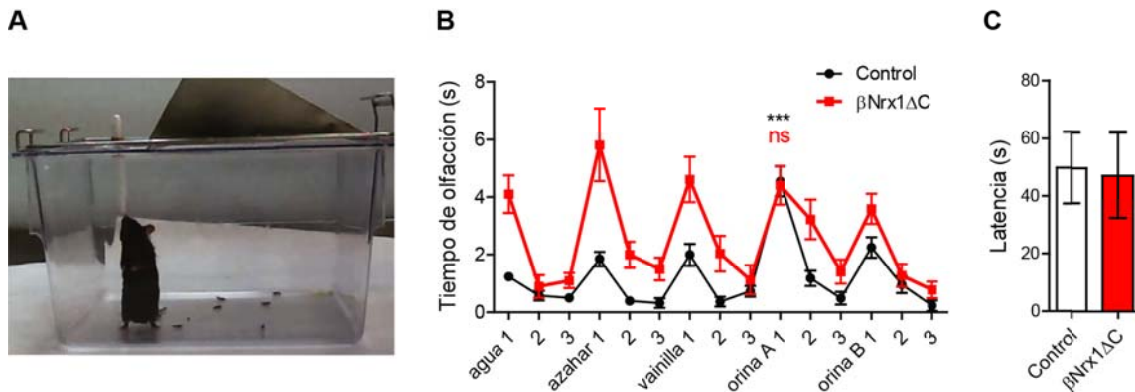


Figura 36. Análisis de la interacción con señales olfativas. A, B.-Test de la habituación/deshabituación de la olfacción. A.- Imagen de la prueba mientras el ratón huele el olor presentado en el bastoncillo. B.- Tiempo de olfacción de los ratones con las presentaciones de olores no sociales (agua, azahar, vainilla) y sociales (orina A, orina B). Los valores 1, 2 y 3 repetidos en el eje de abscisas marcan la primera, segunda y tercera presentación de cada olor, respectivamente. C.- Prueba de enterramiento de comida para evaluar la capacidad de detección de una guía olfativa. Se representa el tiempo en encontrar una porción de pienso enterrada. Tiempo (s) controles: 49.78 ± 12.41 ; β Nrx1 Δ C: 47.22 ± 14.99 . Edad: 2-4 meses. N=9 ratones control; N=9 ratones β Nrx1 Δ C. Edad: 2-4 meses. Análisis estadístico: se realizó con la primera presentación de cada olor utilizando *two-way* ANOVA con medidas repetidas y *post hoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples (B); *t-test* (C). ****p-value* < 0.001. Todas las barras de error son SEM. Realización del test: LGR; análisis de los datos: LGR y ERL.

Los resultados de comportamiento del modelo β Nrx1 Δ C muestran un claro defecto específico de las pruebas que evalúan aspectos relacionados con el comportamiento repetitivo y los defectos en interacción social y comunicación social. Estos defectos en comportamiento no están asociados con una alteración general del comportamiento en otras pruebas conductuales, ya que el comportamiento general (locomoción, aprendizaje motor, memoria) no muestra diferencias entre ratones β Nrx1 Δ C y ratones

control. Por lo tanto, estos resultados apuntan a que la disfunción postnatal de β Nrxs en neuronas del prosencéfalo provoca un comportamiento similar al autismo en el ratón β Nrx1 Δ C.

2.6. Re-evaluación de las pruebas asociadas a los síntomas del TEA en cohortes independientes de ratones machos

Como hemos demostrado, la expresión de la proteína transgénica HA- β Nrx1 Δ C alcanza su máximo nivel de expresión a partir de la tercera semana (Figura 24). Por lo tanto, los ratones evaluados en la cohorte exploratoria del apartado anterior, de 2-4 meses de edad, han sufrido la perturbación en β Nrxs durante un periodo relativamente corto de tiempo. Debido a que los síntomas del TEA aparecen en etapas tempranas pero perduran durante toda la vida adulta, decidimos analizar cómo afecta la disfunción crónica de β Nrxs en etapas más tardías del desarrollo. Por otra parte, debido a la variabilidad interindividual intrínseca de cualquier experimento de comportamiento, es importante replicar los resultados en poblaciones independientes de animales, a ser posible por investigadores independientes y en laboratorios independientes (Kazdoba et al., 2016). En este sentido, cabe resaltar el conflicto que existe por la falta de replicación de los datos de comportamientos asociados al TEA previamente reportados en el ratón KI de NL3 R451C y el ratón KO de NL4 (Chadman et al., 2008; Ey et al., 2012; Stephane Jamain et al., 2008; Jaramillo et al., 2014). Por todo ello, decidimos re-evaluar las pruebas específicas del comportamiento similar al autismo en otras tres cohortes de replicación independientes de ratones adultos a diferentes edades, 3-5 meses, 6 meses y 7-9 meses (Figura 37).

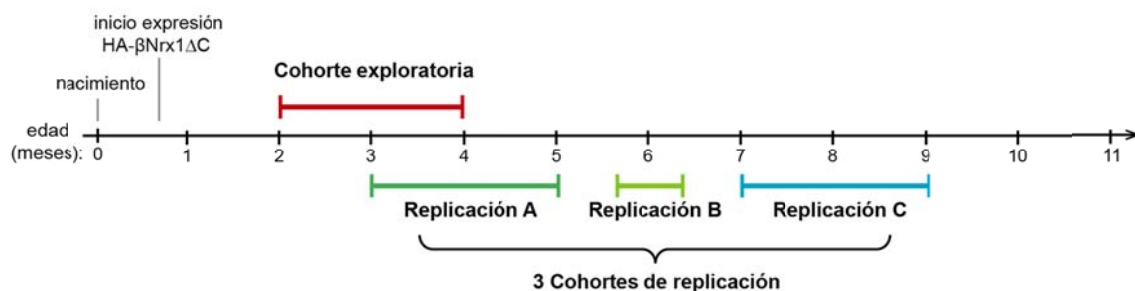


Figura 37. Diagrama explicativo de la edad de las cuatro poblaciones de ratones en las que se analizó el comportamiento asociado al TEA. Los experimentos realizados en la cohorte exploratoria se evaluaron en tres cohortes adicionales de replicación independientes con diferentes edades.

Consistentemente, en las tres cohortes adicionales de ratones adultos observamos la manifestación del fenotipo similar al autismo, que replica los resultados hallados en la primera población de adultos jóvenes analizada (Figuras 34—36). Así, en estos nuevos análisis también observamos de nuevo un incremento al doble en el comportamiento repetitivo de *self-grooming* en los animales β Nrx1 Δ C (Figura 38 A₁, B₁, C₁). En el test de *3-chamber* reproducimos la falta de preferencia social, ya que los ratones β Nrx1 Δ C presentaron una interacción similar con el estímulo social y el no social en las tres cohortes ensayadas (Figura 38 A₂, B₂, C₂). Así mismo, en la segunda fase del test se replicó la falta de preferencia por la novedad social, puesto que los ratones β Nrx1 Δ C presentaron interacción similar con el estímulo social nuevo y el familiar (Figura 38 A₂, C₂). Con respecto a la comunicación social, se reprodujo en los ratones β Nrx1 Δ C una respuesta exagerada hacia olores no sociales, que llegó al nivel de olfacción de los sociales en el test de habituación/deshabituación de la olfacción (Figura 38 A₃, C₃).

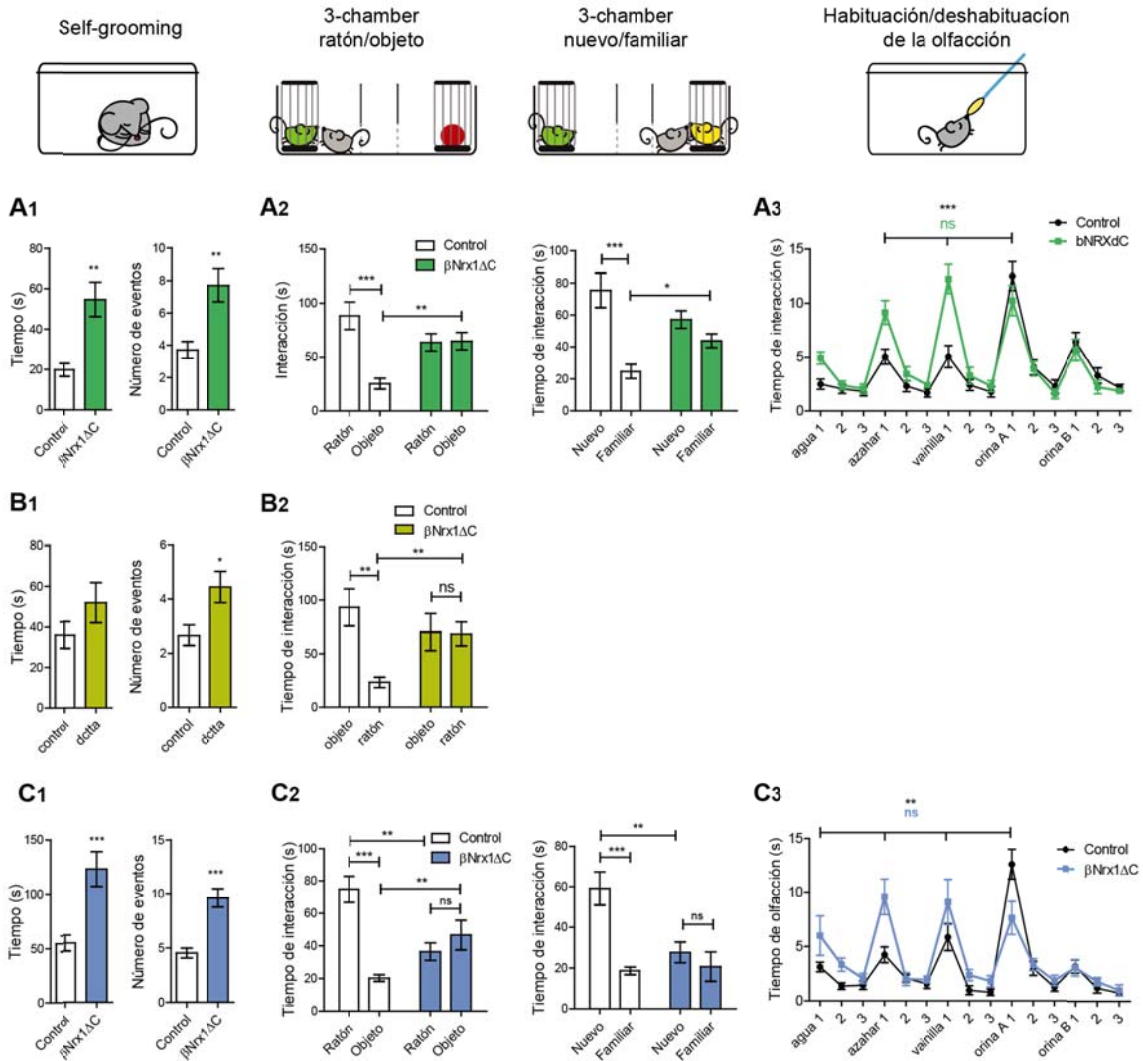


Figura 38. Análisis del comportamiento asociado al autismo en tres cohortes independientes de animales adultos. Los esquemas superiores indican el test realizado en las gráficas inferiores. A₁, B₁, C₁.- Test de *self-grooming*. Cuantificación del tiempo y número de eventos de acicalamiento. A₂, B₂, C₂.- Prueba de sociabilidad *3-chamber*. Se muestra la fase de preferencia social (izquierda) y la fase de preferencia por la novedad social (derecha). A₃, C₃.- Test de habituación/deshabitación de la olfacción. Cohorte A: 9 ratones control y 9 ratones βNrx1ΔC de 6 meses; cohorte B: 10 ratones control y 10 ratones βNrx1ΔC de 3-5 meses; cohorte C: 13 ratones control y 10 ratones βNrx1ΔC de 7-9 meses. Análisis estadístico: *t-test* (A₁, B₁, C₁); *two-way ANOVA* con medidas repetidas y *post hoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples (A₂, A₃, B₂, C₂, C₃). **p-value* < 0.05; ***p-value* < 0.01; ****p-value* < 0.001. Todas las barras de error son SEM. Realización del test: LGR (cohortes A y C) y ERL (cohorte B). Análisis: LGR y ERL.

Los resultados obtenidos en estas nuevas poblaciones de animales confirman el comportamiento repetitivo y el defecto en la comunicación y la interacción social observada en ratones más jóvenes del modelo β Nrx1 Δ C (Figuras 34—36). Este comportamiento asociado al autismo se mantiene a lo largo de la etapa adulta incluso en los ratones β Nrx1 Δ C de mayor edad (Figura 38). Además, existe una gran consistencia de los valores obtenidos, ya que los ratones β Nrx1 Δ C muestran diferencias con los ratones control muy similares entre las diferentes poblaciones de animales, testadas además por dos investigadores participantes. En esta misma línea, el hecho de que los valores de los ratones control de cada cohorte fueron en general muy similares sugiere que el sustrato neuronal responsable del comportamiento repetitivo, la interacción social y la comunicación olfativa se establece en etapas tempranas y se mantiene estable en el rango de edad ensayado. Estos datos demuestran que la expresión postnatal temprana del mutante de β Nrxn1 en el ratón β Nrx1 Δ C produce un robusto comportamiento asociado al autismo y persistente en el tiempo.

2.7. Análisis de la reversión de los defectos asociados con el TEA

Los defectos conductuales similares al TEA observados durante toda la etapa adulta del modelo β Nrx1 Δ C nos sugirió dos posibilidades respecto a su origen. Por un lado, podrían originarse por un efecto restringido en el tiempo durante el desarrollo postnatal, o alternativamente podrían deberse a una disfunción continuada en las neuronas adultas del cerebro maduro.

Durante las primeras semanas postnatales tiene lugar una reorganización sináptica, que mediante la formación, fortalecimiento y eliminación de sinapsis moldea los circuitos neuronales (Erzurumlu et al., 2004). Las perturbaciones ocasionadas durante este período crítico de plasticidad pueden tener consecuencias duraderas que se manifiesten durante la etapa adulta. El período crítico en los ratones comprende aproximadamente desde la primera a la cuarta semana de vida. Debido a que la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C comienza a partir de la 3ª semana postnatal

(Figura 24), no podemos descartar que la disfunción de β Nrxns durante el período crítico cause cambios en los circuitos sinápticos persistentes en el tiempo. Si así fuera, la eliminación de la proteína transgénica en el ratón β Nrx1 Δ C adulto no bastaría para rescatar los defectos de comportamiento. Sin embargo, si los defectos de comportamiento observados en el ratón β Nrx1 Δ C se debieran a un defecto continuo de β Nrxns, que se mantuvieran mientras el mutante estuviera integrado en el circuito sináptico, el apagado de la expresión del mutante de β Nrxn1 sería suficiente para revertir el efecto.

Para distinguir entre estas dos posibilidades, tomamos ventaja del sistema inducible Tet-off y volvimos a analizar el fenotipo del ratón β Nrx1 Δ C tras apagar la expresión del transgén con Dox. Para ello, tratamos con Dox durante dos semanas a los ratones de la población más joven analizada (2-4 meses) y a los de mayor edad (9-11 meses), tras lo cual re-evaluamos las pruebas específicas con relevancia en autismo. Para evitar cualquier efecto potencial causado por la repetición de las pruebas, el tratamiento con Dox y la re-evaluación posterior se distanciaron dos meses desde la primera evaluación en los ratones de mayor edad.

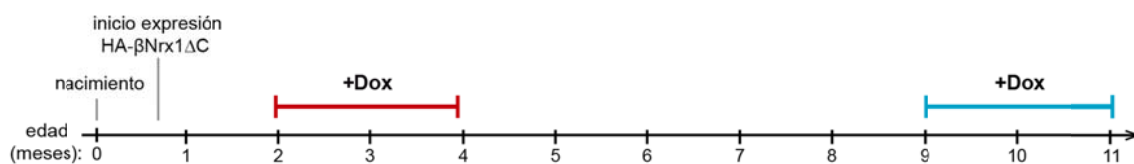


Figura 39. Diagrama explicativo del experimento de apagado de la expresión de HA- β Nrx1 Δ C en dos cohortes de animales de diferente edad.

Mientras que la dieta Dox en los animales control no supuso un cambio sobre el comportamiento, las dos cohortes de ratones β Nrx1 Δ C tratados con Dox mostraron una reversión consistente del fenotipo en las pruebas que evalúan aspectos relacionados con autismo. En el análisis del comportamiento repetitivo de *self-grooming*, el tiempo y número de eventos de acalamiento se redujeron al nivel de los controles en ambas cohortes (Figuras 40 A, 41 A). En la fase de preferencia social de la prueba de sociabilidad *3-chamber* los ratones β Nrx1 Δ C tratados con Dox mostraron un

incremento significativo de interacción con el estímulo social frente al no social, que resultó en la discriminación de los dos estímulos. De la misma manera, en la fase de preferencia por la novedad social, los ratones β Nrx1 Δ C tratados con Dox incrementaron la interacción con el ratón nuevo, mostrando una mayor preferencia por la novedad social que antes del tratamiento (Figuras 40 B y 41 B). En la prueba de habituación/deshabitación de la olfacción, los ratones β Nrx1 Δ C tratados con Dox recuperaron la discriminación entre los olores sociales y no sociales, mediante un descenso de interacción con los olores no sociales (figura 40 C y 41 C).

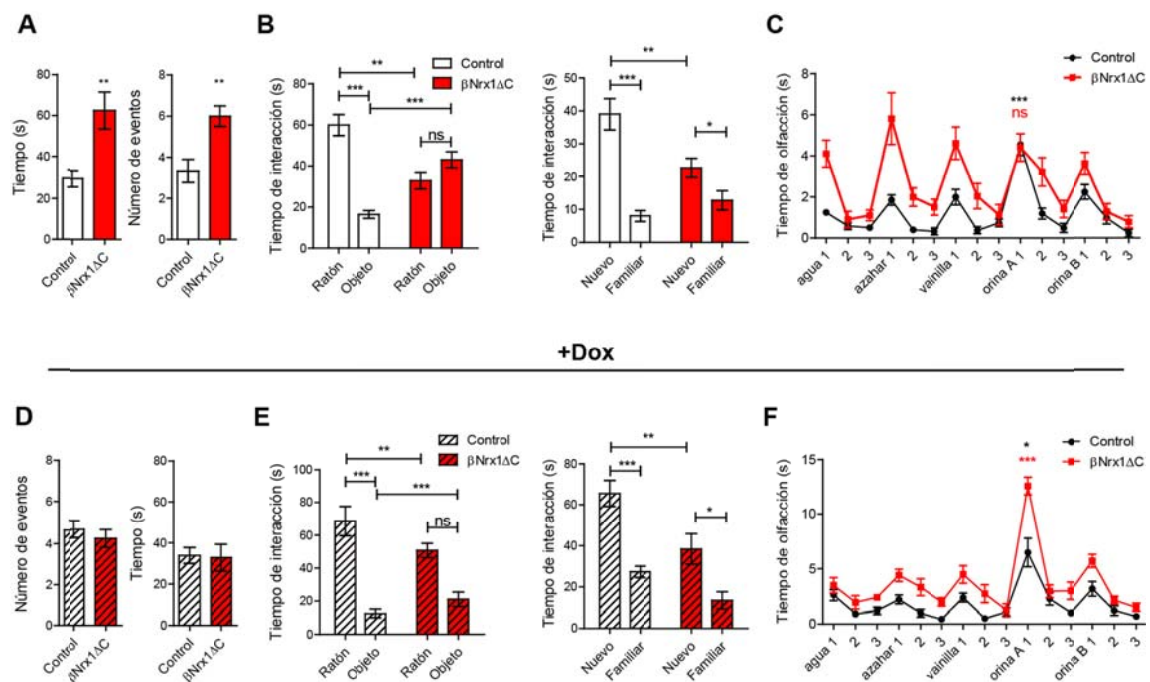


Figura 40. Reversión del comportamiento relacionado con el autismo en ratones β Nrx1 Δ C jóvenes (2-4 meses). En la figura se comparan los experimentos antes y después del tratamiento con Dox. Los resultados previos al tratamiento (A-C) ya habían sido mostrados en las figuras 34—36 anteriores, pero se representan de nuevo para facilitar la comparación con los resultados tras el tratamiento con Dox (D-F). A, D.- Test de *self-grooming*. Tiempo (izquierda) y número de eventos (derecha) de acicalamiento. B, E.- Test de sociabilidad 3-*chamber*. Fase de preferencia social (izquierda) y fase de preferencia por la novedad social (derecha). C, F.- Test de habituación/deshabitación de la olfacción frente a olores no sociales y sociales. N=9 ratones control; N=9 ratones β Nrx1 Δ C. Edad: 2-4 meses. Análisis estadístico: *t-test* (A, D); *two-way* ANOVA con medidas repetidas y *post hoc* de Bonferroni con

comparaciones múltiples (B, C, E, F). * p -value < 0.05; ** p -value < 0.01; *** p -value < 0.001. Todas las barras de error son SEM. Realización del test: LGR. Análisis: LGR y ERL.

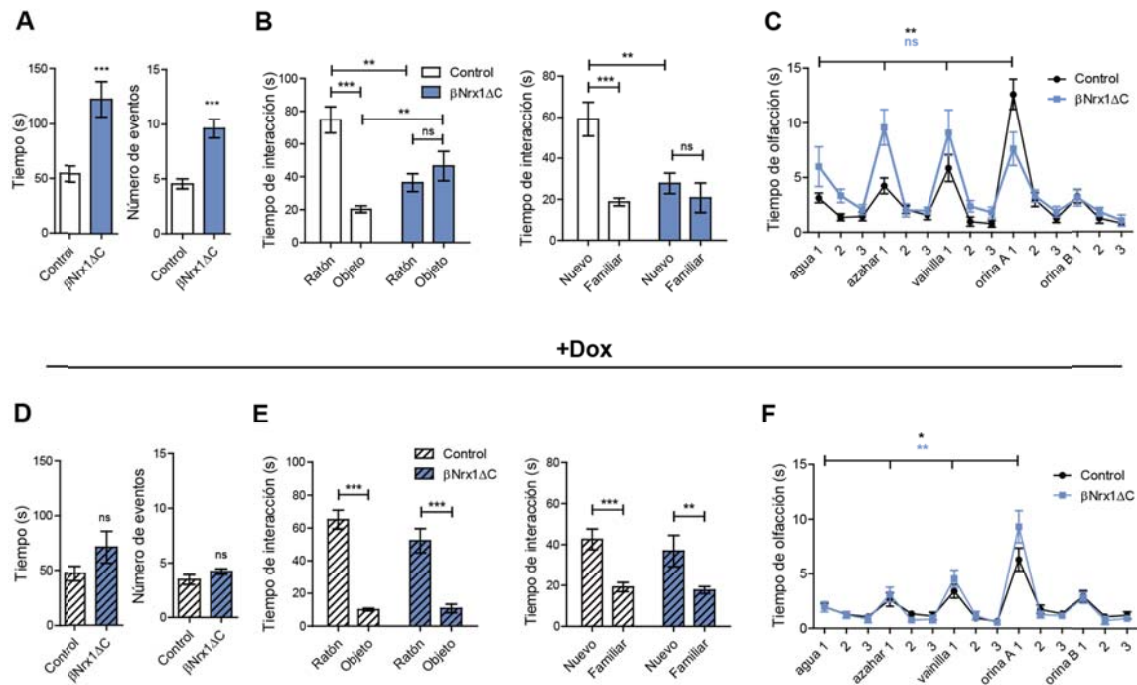


Figura 41. Reversión del comportamiento relacionado con el autismo en ratones β Nrx1 Δ C de mayor edad (9-11 meses). En la figura se comparan los experimentos antes y después del tratamiento con Dox. Los resultados previos al tratamiento (A-C) ya habían sido mostrados en las figuras 38 anteriores, pero se representan de nuevo para facilitar la comparación con los resultados tras el tratamiento con Dox (D-F). A, D.- Test de *self-grooming*. Tiempo (izquierda) y número de eventos (derecha) de acicalamiento. B, E.- Test de sociabilidad *3-chamber*. Fase de preferencia social (izquierda) y fase de preferencia por la novedad social (derecha). C, F.- Test de habituación/deshabitación de la olfacción frente a olores no sociales y sociales. N=9 ratones control; N=9 ratones β Nrx1 Δ C. Edad: 7-9 meses antes de Dox (A-C), 9-11 meses en la reversión (D-F). Análisis estadístico: *t*-test (A, D); *two-way* ANOVA con medidas repetidas y *post hoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples (B, C, E, F). * p -value < 0.05; ** p -value < 0.01; *** p -value < 0.001. Todas las barras de error son SEM. Realización del test: LGR. Análisis: LGR y ERL.

La reversión de los defectos de comportamiento, obtenida incluso en ratones de edad avanzada, indica que la disfunción crónica de β Nrxns en las neuronas adultas del

proencéfalo es la causa del fenotipo relacionado con el autismo observado en los ratones β Nrx1 Δ C, ya que la eliminación de la perturbación es suficiente para revertir los defectos en comportamiento a cualquier edad.

2.8. Análisis de comportamiento social en hembras del modelo de autismo β Nrx1 Δ C

Como hemos explicado en la introducción, los datos epidemiológicos de TEA muestran un ratio 4:1 en la incidencia de TEA en niños y en niñas (Christensen et al., 2016). A pesar de que a esta diferencia podrían contribuir sesgos en el diagnóstico parece existir una cuestión biológica en la diferente prevalencia del TEA (Frazier et al., 2014). Datos genéticos sugieren un umbral de aparición de los síntomas mayor en las niñas, ya que la carga mutacional de niñas afectas es mayor que la de los niños afectos (Halladay et al., 2015).

El gen *NRXN1* se encuentra en el cromosoma 2 humano (cromosoma 17 murino). Como no es un gen ligado al cromosoma X esperamos que las mutaciones asociadas a la disfunción de *Nrxns* encontradas en pacientes con TEA afecten con igual proporción a hombres y mujeres. Sin embargo, la manifestación fenotípica de estas mutaciones podría variar entre ambos sexos si existieran factores no genéticos que protegieran del desarrollo de los síntomas en niñas. Por ello, decidimos abordar la cuestión de si la disfunción de β Nrxns del modelo β Nrx1 Δ C reproduce en hembras los resultados de comportamiento encontrados en poblaciones de ratones machos.

En una población de 13 ratonas control (diez *wild-type*, dos simples transgénicas TRE-HA- β Nrx1 Δ C y una simple transgénica CaMKII-tTA) y 12 ratonas β Nrx1 Δ C adultas (5-10 meses de edad) no sincronizadas hormonalmente se realizaron las pruebas comportamentales relacionadas con el autismo más representativas en nuestro modelo. Analizamos el comportamiento repetitivo mediante el test de *self-grooming* y la interacción social mediante prueba de sociabilidad *3-chamber*.

Como podemos ver en la figura 42, las ratonas β Nrx1 Δ C tuvieron un incremento en el comportamiento repetitivo de *self-grooming*, con un mayor tiempo de acicalamiento

que las hembras control. El número de eventos de *self-grooming* también estaba incrementado en las ratonas β Nrx1 Δ C, aunque no alcanzó significancia estadística en este ensayo. Al calcular el tiempo promedio de cada secuencia de acicalamiento, observamos un incremento en las hembras β Nrx1 Δ C con respecto a las ratonas control, que sugiere una mayor persistencia en eventos individuales (figura 42). Esto representa una diferencia cualitativa con respecto al comportamiento en ratones macho, en los que el tiempo medio por evento no estaba alterado (figura 34).

En la fase de preferencia social del test de *3-chamber* las hembras control mostraron una mayor interacción con el estímulo social (ratona) frente al no social (objeto). Sin embargo, las hembras doble transgénicas no presentaron dicha preferencia, que se reflejó en una interacción exagerada con el objeto (figura 42). A pesar de que la interacción con el estímulo social pareció no disminuir significativamente en las ratonas β Nrx1 Δ C, la suma de interacción total con los dos estímulos no se vio alterada, de forma similar a lo observados en los ratones machos (figura 35).

En la fase de la preferencia por la novedad social en la prueba de *3-chamber* observamos que la interacción de las hembras control con la ratona desconocida estaba incrementado frente a la familiar, aunque en este caso no alcanzó significancia estadística (figura 42). En las hembras β Nrx1 Δ C se detectó una tendencia a la baja en la preferencia por la novedad social.

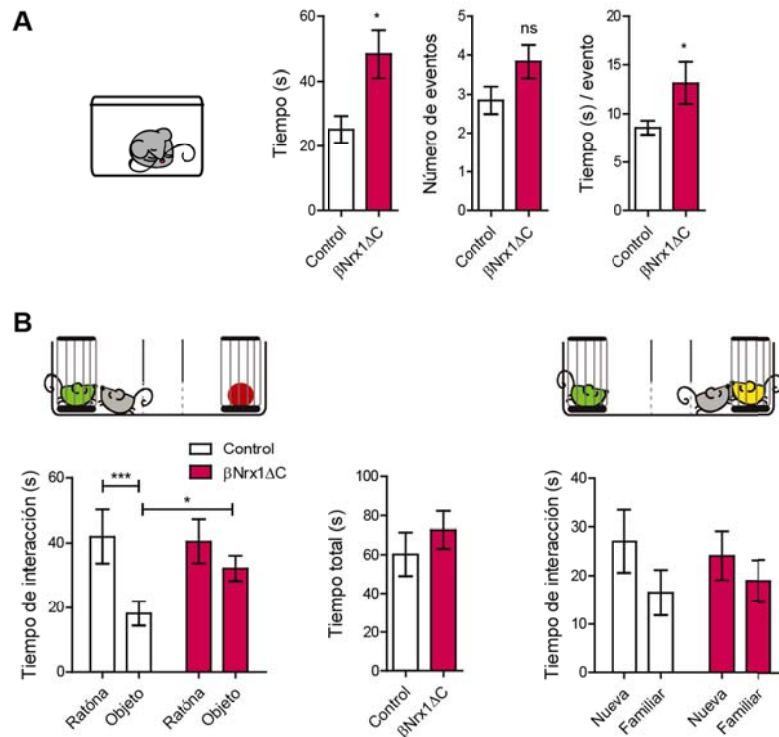


Figura 42. Análisis del comportamiento relacionado con el autismo en hembras β Nrx1 Δ C. A.- Test de *self-grooming* repetitivo. De izquierda a derecha, tiempo de acicalamiento, número de secuencias de acicalamiento y tiempo medio por evento de acicalamiento. B.- Prueba de sociabilidad *3-chamber*. De izquierda a derecha, fase de preferencia social (ratóna u objeto), interacción total de esta fase, e interacción en la fase de preferencia por la novedad social (ratóna nueva o familiar). N=13 ratonas control; N=12 ratonas β Nrx1 Δ C. Análisis estadístico: *t-test* (A, gráfica central de B); *two-way ANOVA* de medidas repetidas y post hoc de Bonferroni con comparaciones múltiples (B). Todas las barras de error son SEM. **p-value* < 0.05; ****p-value* < 0.001. Realización y análisis del test: ERL

Los resultados de las pruebas de comportamiento relacionado con los síntomas del autismo realizadas en hembras β Nrx1 Δ C muestran unos resultados similares a los hallados en machos. Los datos de *self-grooming* muestran un comportamiento repetitivo en ratones de ambos sexos, aunque parece que el origen de ese incremento tenga en hembras un componente adicional, debido a un incremento en el tiempo medio de las secuencias de acicalamiento. Pese a ello, la medida de tiempo total de *self-grooming* representa una lectura del comportamiento repetitivo en el modelo β Nrx1 Δ C, incrementado en ambos grupos. Además, la prueba de sociabilidad *3-chamber* muestra un robusto resultado de pérdida de la preferencia por la sociabilidad

en hembras y en machos. Por ello, podemos concluir que la disfunción postnatal de β Nrxns del ratón β Nrx1 Δ C provoca un fenotipo similar al autismo en ratones machos y hembras. Por ello, la generación del ratón β Nrx1 Δ C puede representar un nuevo organismo modelo para analizar la patología asociada al TEA en ambos sexos.

3. Posibles mecanismos afectados en el modelo β Nrx1 Δ C

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que la presencia en el terminal presináptico del mutante HA- β Nrx1 Δ C causa un defecto en la transmisión sináptica que se traduce en un fenotipo similar al autismo. Para explorar los mecanismos sinápticos afectados en el modelo β Nrx1 Δ C, analizamos algunos elementos que podrían explicar los mecanismos moleculares subyacentes, como son alteraciones en componentes de la sinapsis y en la densidad sináptica, defectos en la modulación mediada por eCBs y alteraciones en la expresión génica.

3.1. Análisis de los niveles de proteínas sinápticas candidatas

La ausencia del dominio citoplásmico en el mutante HA- β Nrx1 Δ C podría desplazar ligandos esenciales fuera de la sinapsis que a la postre fueran los responsables de los defectos sinápticos y de comportamiento. Para intentar identificar dichos ligandos analizamos una batería de proteínas sinápticas candidatas por *western blot* en preparaciones de sinaptosomas. De este modo evitamos diluir posibles efectos en los niveles de las proteínas sinápticas con lisados totales. Como candidatas al análisis seleccionamos proteínas implicadas en la adhesión transsináptica (β Nrxn1, NL1, NL2, NL3), proteínas con función en el reclutamiento vesicular y/o en la liberación de neurotransmisores (Cask, Mint1, Liprinas, Rim1, Sinapsinas, Sinaptobrevina, SNAP25, Munc18), proteínas de andamiaje postsináptico (PSD-95, Gefirina) y receptores de glutamato (GluA1, GluA2, GluN1, mGlu₅).

Comparamos tres purificaciones independientes de sinaptosomas obtenidos de la corteza a partir de animales control o dobles transgénicos, igualando la cantidad de proteína cargada entre ellas. En estos experimentos no encontramos cambios significativos en los niveles de la batería de proteínas sinápticas analizadas, lo cual descarta un defecto general en la composición de las sinapsis en el modelo β Nrx1 Δ C (figura 43).

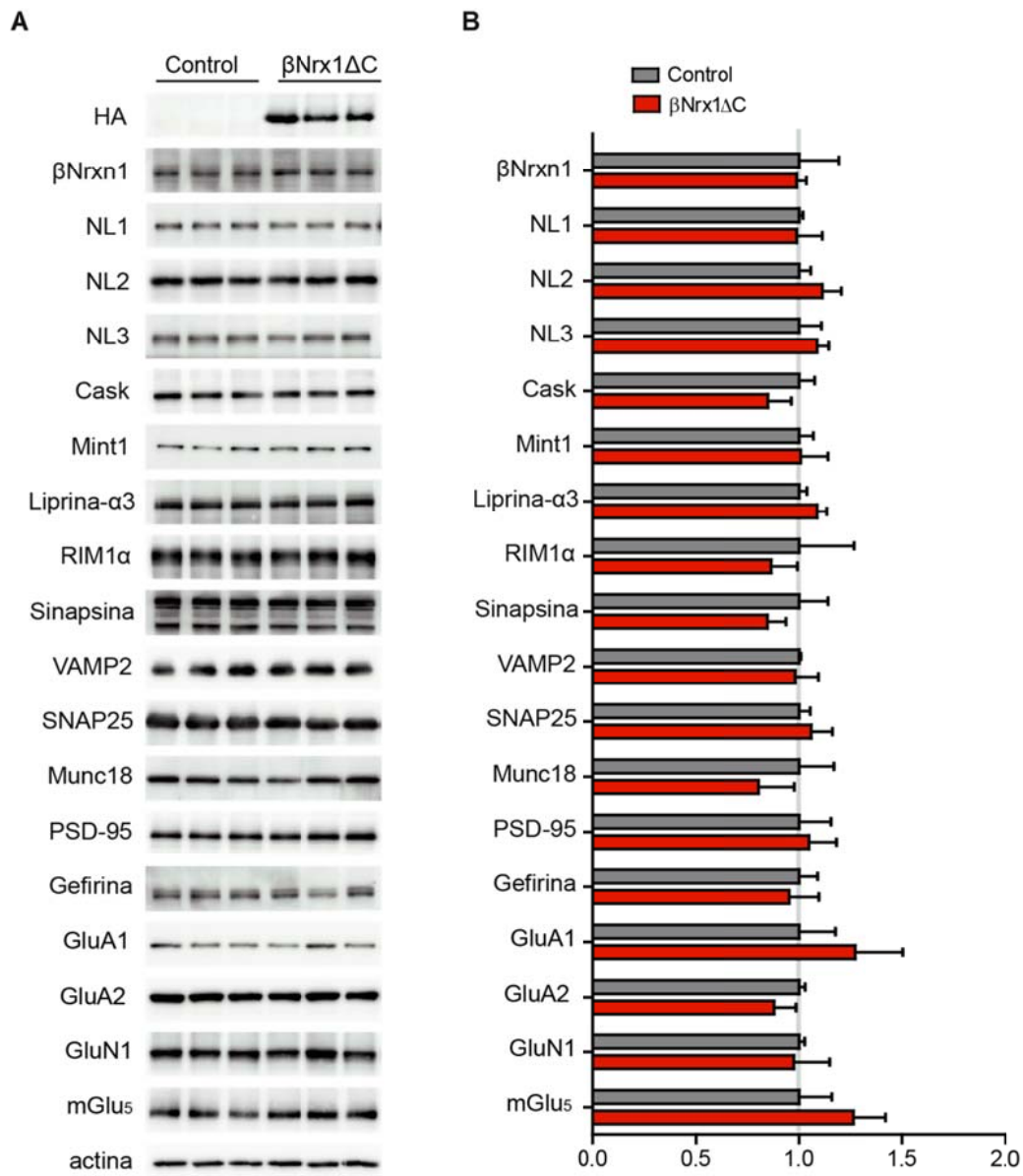


Figura 43. Análisis de una batería de proteínas sinápticas candidatas en sinaptosomas por *western blot*. A.- Imágenes representativas de las proteínas testadas. B.- Cuantificaciones del experimento. Se representa el promedio de las tres réplicas de cada condición. Análisis estadístico: *t-test*. Todas las barras de error son SEM.

Aunque intentamos maximizar el número de proteínas analizadas por *western blot*, este experimento está limitado por la disponibilidad de anticuerpos específicos y por el número relativamente pequeño de candidatos que se pueden analizar. Para superar esta limitación, decidimos analizar mediante un abordaje masivo de proteómica la composición relativa de los terminales sinápticos en el Servicio de Proteómica del

Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). El método elegido fue nano LC-MS/MS (nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas) con iTRAQ (del inglés *Isobaric tags for relative and absolute quantitation*), que permite comparar la abundancia relativa de proteínas entre varias preparaciones diferentes marcadas con distinto isótopo isobárico. Obtuvimos cuatro nuevas purificaciones de sinaptosomas de animales control y tres de ratones β Nrx1 Δ C. Una octava muestra se obtuvo al combinar una fracción de las cuatro muestras control para ser utilizada como referencia interna. Las proteínas de cada muestra se digirieron con tripsina y se marcaron con la correspondiente etiqueta de iTRAQ (113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 y 121). Posteriormente las ocho preparaciones se combinaron para ser analizadas en paralelo por nano LC MS/MS en un espectrómetro de masas.

A partir de los péptidos detectados, el Servicio de Proteómica realizó una identificación de las proteínas cuantificables y de su nivel relativo para cada etiqueta de iTRAQ. Aplicamos sobre este listado de proteínas un filtro de calidad. Para ello seleccionamos las proteínas que tuvieran asociada una puntuación de la calidad de detección o SCORE superior a cero, obteniendo un listado de 1.758 proteínas.

En el listado filtrado de proteínas observamos un comportamiento no esperado, puesto que dentro de un mismo grupo (control o β Nrx1 Δ C) la detección global de proteínas era muy diferente para cada muestra, pese a haber partido de la misma cantidad inicial de proteína (110 μ g). Esta variabilidad se reflejó incluso en el promedio de la cantidad de todas las proteínas, que como podemos ver en la tabla 9, presentaban diferencias de hasta 10 veces entre muestras del mismo grupo (por ejemplo, los controles varían desde 1.16 a 0.15). Debido a esta variabilidad no pudimos comparar directamente la cantidad de proteínas concretas entre las diferentes muestras.

Para intentar obtener más información de este experimento, homogeneizamos los datos utilizando el promedio de la detección del conjunto de proteínas de cada muestra. Para ello, normalizamos la cantidad de cada proteína de una muestra con respecto al promedio de todas las proteínas en esa muestra.

Isótopo	Control				β Nrx1 Δ C		
	115/113	114/113	117/113	119/113	116/113	118/113	121/113
Promedio de la señal:	1,66	0,23	0,15	0,96	1,54	0,14	1,28
Promedio normalizado	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Tabla 9. Señal promedio de todas las proteínas en cada muestra de sinaptosomas analizada con iTRAQ. Se muestra el promedio antes y después de la normalización.

A partir de los datos normalizados calculamos el promedio de detección de las proteínas en los dos grupos y los comparamos con el ratio β Nrx1 Δ C/control para obtener el nivel de cambio. Decidimos establecer un umbral de cambios del 20% ($0.8 > \text{ratio} > 1.2$). Con las 95 proteínas que lo superaron (listado en anexo 1.1) realizamos un análisis preliminar del enriquecimiento de rutas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), que relacionan genes y proteínas según sus funciones en la célula y el organismo. Para este abordaje utilizamos la plataforma STRING, que analiza interacciones funcionales entre las proteínas seleccionadas y puntúa la probabilidad de enriquecimiento de las rutas KEGG (Szklarczyk et al., 2017). En la tabla 10 se muestran las 10 rutas KEGG más significativamente enriquecidas en este análisis (listado completo de rutas KEGG en anexo 1.2). Entre ellas encontramos algunas que resultan muy interesantes para nuestro modelo, como por ejemplo las relacionadas con la señalización glutamatergica y GABAérgica, la señalización retrógrada por eCBs y las rutas de señalización de calcio. El anexo 1.3 recoge el listado de proteínas asociadas a estas rutas KEGG y su ratio obtenido en el experimento de iTRAQ. La señalización glutamatergica y GABAérgica se encuentran alterados en el modelo β Nrx1 Δ C, que como hemos demostrado presenta una reducción en la frecuencia de mEPSCs y mIPSCs (figura 29), por lo que las proteínas con expresión alterada en los ratones β Nrx1 Δ C relacionadas con las rutas KEGG *Glutamatergic synapse* y *GABAergic synapse* son susceptibles de mediar dichos defectos. Por ejemplo, observamos una reducción en el receptor metabotrópico de glutamato mGlu₁ y un aumento en los niveles de Shank3, dos proteínas que forman un complejo a través de Homer en el terminal postsináptico y que están relacionadas con autismo (Bariselli et al., 2016; Monteiro et al., 2017; Tu et al., 1999). La señalización retrógrada por eCBs modula la liberación de

neurotransmisores y, como se menciona en la Introducción, ha sido recientemente asociada a disfunciones en la ruta Nrnx/NLs (Anderson et al., 2015; Földy et al., 2013). Las proteínas asociadas con la ruta KEGG *Retrograde endocannabinoid signaling* representan por ello posibles candidatos a estar afectados por la disfunción de β Nrxns en el modelo β Nrx1 Δ C. Por ejemplo, encontramos un incremento en la proteína degradadora de AEA FAAH. Por último, las rutas de señalización de calcio son imprescindibles para la liberación de neurotransmisores, que como hemos mostrado en los Antecedentes de esta Tesis Doctoral se encuentra reducida por la expresión de HA β Nrx1 Δ C *in vitro* (figura 15). Además, la función presináptica de Nrnxns se ha relacionado con la transmisión mediada por calcio (Missler et al., 2003). Por ello, sería interesante confirmar los cambios de expresión en proteínas relacionadas con la ruta KEGG *Calcium signaling pathway*, como por ejemplo el incremento en la molécula de unión a Ca^{2+} calmodulina o la reducción en los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje Cacna1c. Sin embargo, debido a la variabilidad de los datos crudos de iTRAQ, estos resultados preliminares suponen sólo un indicio de posibles rutas afectadas y es necesario optimizar el experimento para poder obtener datos más fiables.

KEGG PATHWAYS			
<i>#pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>observed gene count</i>	<i>fdr</i>
4724	Glutamatergic synapse	8	6.04e-06
4723	Retrograde endocannabinoid signaling	7	2.97e-05
1120	Microbial metabolism in diverse environments	7	0.000592
4020	Calcium signaling pathway	7	0.000601
4727	GABAergic synapse	5	0.00177
4713	Circadian entrainment	5	0.00193
1200	Carbon metabolism	5	0.00323
1100	Metabolic pathways	15	0.00382
4720	Long-term potentiation	4	0.00382
4670	Leukocyte transendothelial migration	5	0.00405

Tabla 10. Enriquecimiento de rutas KEGG en las proteínas que presentan un cambio superior al 20% en las muestras β Nrx1 Δ C ($0.8 > \text{ratio} > 1.2$). Esta tabla incluye los 10 términos que muestran mayor significancia estadística según la plataforma STRING. Se muestra el identificador de la ruta KEGG (*#pathway ID*), la descripción de la ruta (*pathway description*), el número de proteínas analizadas que se relacionan con esa ruta (*observed gene count*) y la significancia estadística que tiene el enriquecimiento en esa ruta (*fdr*, de *false discovery rate*).

3.2. Análisis de la densidad de espinas dendríticas

La reducción en la frecuencia de mEPSCs detectada en el ratón β Nrx1 Δ C se podría explicar por una menor probabilidad de liberación o alternativamente por un descenso en el número de sinapsis glutamatérgicas. Cabe resaltar que se han descrito cambios en el número de sinapsis excitatorias asociados a pacientes con TEA y en diferentes modelos animales de autismo (Hutsler et al., 2010; Martínez-Cerdeño, 2017; Peça et al., 2011). Por ello analizamos la densidad de espinas dendríticas, que son protrusiones de las dendritas donde tienen lugar la mayoría de las sinapsis glutamatérgicas (Alvarez et al., 2007). Decidimos abarcar esta cuestión mediante la tinción de Golgi-Cox (Cox, 1891; Zaqout et al., 2016), que permite visualizar con gran detalle la morfología de neuronas aisladas. Mediante esta técnica se impregnan al azar un limitado número de células (3-5%) de depósitos de cloruro de mercurio (Spacek, 1989; Stean, 1974). A partir de imágenes de gran resolución tomadas con un microscopio óptico se pueden cuantificar las espinas que presenta un segmento dendrítico determinado.

Realizamos la tinción de Golgi-Cox en el cerebro de cinco animales control y cuatro animales β Nrx1 Δ C. En ellos cuantificamos la densidad de las espinas dendríticas en dos tipos celulares que expresan el transgén y con los que muy probablemente contactan axones de células que expresan el mutante HA- β Nrx1 Δ C: las neuronas piramidales de las capas 5-6 de la corteza (sinapsis cortico-corticales excitatorias entre neuronas piramidales) y las *Medium Spiny Neurons* (MSNs) del estriado dorsal (proyecciones cortico-estriatales glutamatérgicas).

3.2.1 Corteza somatosensorial primaria

Las neuronas principales de la corteza son las neuronas piramidales, que realizan conexiones entre ellas y también proyectan a diferentes regiones subcorticales del cerebro. Los somas se distribuyen en las capas 2-3 y 5-6 de la corteza y de ellos parten las dendritas basilares y el tronco apical, dendrita más gruesa que a su vez se ramifica en dendritas de menor calibre (Shepherd, 2004, 2013). Se han descrito alteraciones en la densidad de espinas dendríticas en el tronco apical de estas neuronas en pacientes

con TEA (Hutsler et al., 2010). Además, mediante electrofisiología hemos demostrado una reducción de la frecuencia de mEPSCs en las neuronas piramidales de las capas 5-6 (figura 29). Dado que estas neuronas son candidatas a tener afectada la densidad de espinas dendríticas, realizamos un análisis de la densidad de espinas dendríticas que presentan en el tronco apical. Como observamos que la densidad de espinas dendríticas iba incrementándose con la distancia al soma, para estos análisis decidimos subdividir el tronco apical en dos segmentos, situados a diferente distancia del cuerpo celular (figura 44 C):

- Segmento apical proximal: segmento de 30 μm a partir de la primera espina del tronco apical.
- Segmento apical distal: segmento de 30 μm que comienza 45 μm tras la primera espina del tronco, o lo que es lo mismo, 15 μm posterior al final del segmento proximal.

Tomamos imágenes del tronco apical de aproximadamente cuatro neuronas piramidales de cada ratón, captando tantos planos seriados en el eje Z separados por 0,5 μm como fueran necesarios para poder enfocar con claridad toda la longitud de la dendrita a cuantificar (la figura 44 D muestra uno de esos planos). Tras el contaje manual del número de espinas dendríticas, realizamos el promedio de la densidad de espinas en cada segmento. Como se puede ver en la figura 44 E, observamos una tendencia a la reducción en la densidad de espinas dendríticas en el segmento apical proximal de los ratones $\beta\text{Nrx1}\Delta\text{C}$, aunque la diferencia no alcanza significancia estadística. En el segmento apical distal esta tendencia a la reducción se pierde. En cualquier caso, la magnitud del ligero cambio en el segmento apical proximal no sería suficiente para explicar por completo el descenso del 50% en la frecuencia de mEPSCs.

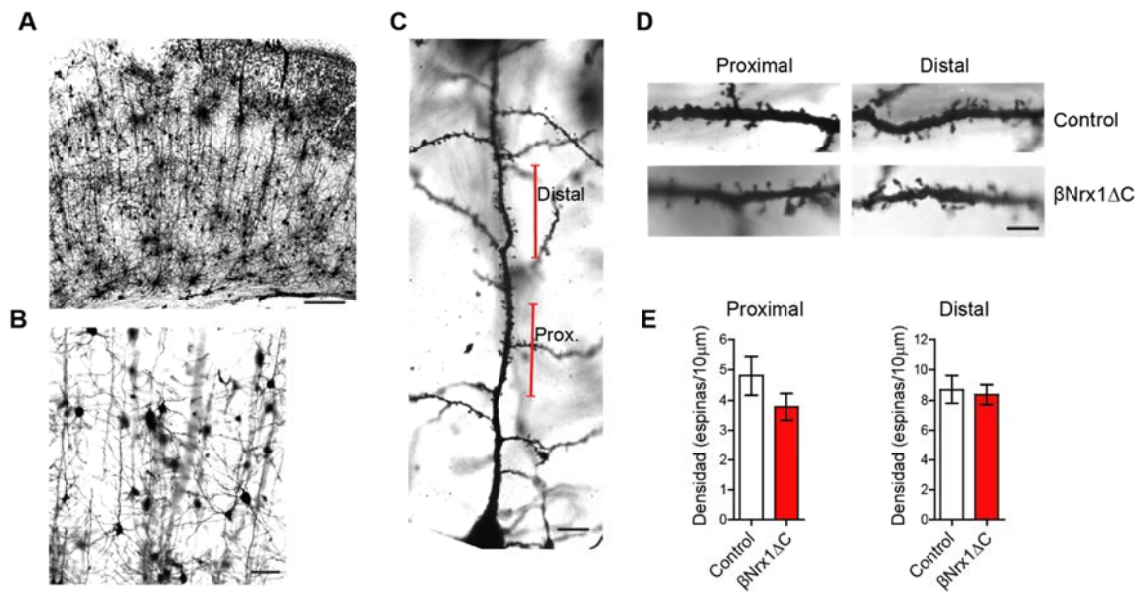


Figura 44. Análisis de densidad de espinas dendríticas en la corteza mediante la tinción de Golgi-Cox. A.- Visión general de la corteza impregnada de Golgi-Cox. B.- Magnificación de las capa 5-6 de la corteza. C.- Tronco apical de una neurona piramidal, sobre el que está indicada la distribución de los segmentos cuantificados. D.- Ejemplos de segmentos de 30µm cuantificados. La imagen muestra solamente un plano individual en el eje Z, por lo que algunas espinas están fuera de foco. E.- Gráficas resultantes de la cuantificación de la densidad de espinas dendríticas. N=19 neuronas y N=15 neuronas de ratones control y βNrx1ΔC, respectivamente. Análisis estadístico: *t-test* (E). Escalas de tamaño: 500µm (A), 50µm (B), 10µm (C), 5µm (D).

3.2.2 Estriado dorsal

Las MSNs son las neuronas principales del estriado, ya que representan el 90% de las neuronas estriatales. La principal aferencia que reciben procede de la corteza, principalmente de las regiones sensorial, motora y cingulada (Guo et al., 2015; Wall et al., 2013), áreas en las que el ratón transgénico βNrx1ΔC expresa altos niveles de la proteína transgénica (figura 22). Por ello, aunque la respuesta electrofisiológica de las MSNs en el ratón βNrx1ΔC no se ha determinado, las MSNs son un substrato neuronal candidato a sufrir alteraciones en la densidad de espinas dendríticas ocasionadas por la expresión del mutante de βNrxn1. Como se puede observar en el panel C de la figura 45, las MSNs tienen una morfología radial, una compleja arborización y están muy

decoradas por espinas (Shepherd, 2004). Las dendritas que parten directamente desde el soma no presentan espinas y se denominan primarias, a partir de éstas se numeran las siguientes ramificaciones. Debido a que cada nivel de ramificación puede presentar diferente densidad de espinas dendríticas se analizaron por separado las dendritas secundarias y terciarias (Figura 45 C).

Seleccionamos aproximadamente cinco neuronas de cada ratón con morfología típica de las MSNs y de cada una tomamos imágenes a diferentes planos seriados del eje Z de cuatro dendritas secundarias y cuatro terciarias para su cuantificación (ejemplos de uno de esos planos en figura 45 D). Las cuantificaciones de estos experimentos no mostraron diferencias significativas en la densidad de espinas ni en dendritas secundarias ni en terciarias, si acaso existe una muy ligera tendencia a la reducción en ambos casos en los ratones β Nrx1 Δ C (figura 45 E).

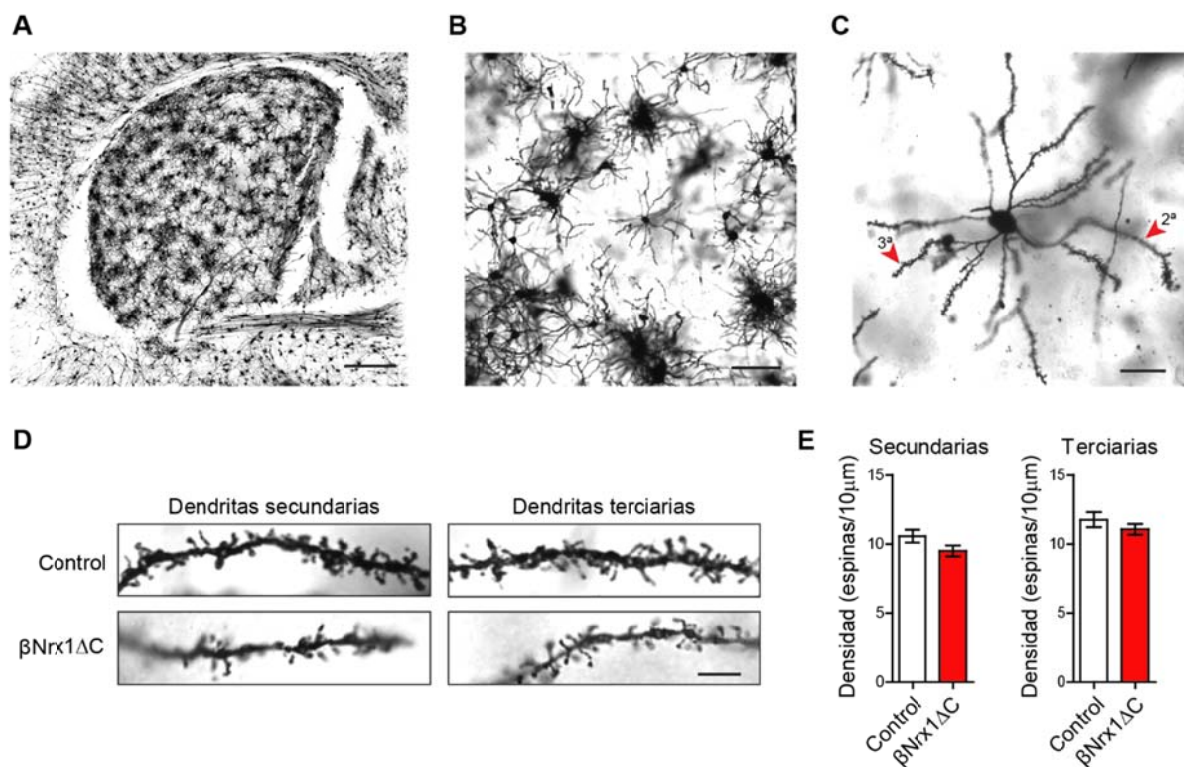


Figura 45. Análisis de la densidad de espinas dendríticas en neuronas del estriado mediante la tinción Golgi-Cox. A.- Vista general del estriado dorsal impregnado con la tinción de Golgi-Cox. B.- Neuronas del estriado. Las neuronas más individualizadas son más aptas para su cuantificación. C.- Neurona con morfología de MSN. Se señala un ejemplo de dendritas secundaria (2^a) y terciaria (3^a). D.- Detalle de segmentos para visualizar las espinas dendríticas

en dendritas secundarias y terciarias de animales control y β Nrx1 Δ C, como se indica. E.- Cuantificación de la densidad de espinas en dendritas secundarias y terciarias. N= 26 y 23 neuronas de animales control y β Nrx1 Δ C, respectivamente. Análisis estadístico: *t-test*. Escalas de tamaño: 500 μ m (A), 100 μ m (B), 25 μ m (C), 5 μ m (D).

El conjunto de estos resultados indica que la densidad de espinas dendríticas en corteza y estriado no parece estar alterada en los ratones β Nrx1 Δ C. Estos datos sugieren que el descenso del 50% en la frecuencia de mEPSCs en las neuronas piramidales de la corteza no se debe a una reducción en paralelo del número de sinapsis glutamatérgicas y hacen pensar en la contribución de mecanismos presinápticos que afecten la probabilidad de liberación.

3.3. Análisis de los niveles de eCBs y compuestos relacionados en muestras de corteza

Como hemos explicado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, el sistema eCB es un sistema neuromodulador dependiente de actividad sináptica que recientemente se ha asociado con la ruta Nrxns/NLs. Los ratones KO de NL3 y KI de NL3-R451C muestran una reducción en la señalización tónica de eCBs que causa un incremento de la transmisión sináptica inhibitoria de las interneuronas CCK sobre las neuronas piramidales del hipocampo (Földy et al., 2013). Por otra parte, se ha sugerido que las β Nrxns podrían ejercer de freno en la producción de eCBs, ya que el TKO β Nrxn1-3 provoca un incremento en la señalización tónica de eCBs asociado a un descenso en la transmisión glutamatérgica (Anderson et al., 2015). Sin embargo, en ninguno de los trabajos anteriores se midieron los niveles de eCBs.

La disfunción en β Nrxns generada en nuestro modelo β Nrx1 Δ C provoca una disminución de la transmisión sináptica glutamatérgica *in vivo* (figura 29). Debido a la similitud de esos efectos con la inhibición en la transmisión glutamatérgica descrita en las neuronas TKO β Nrxn1-3, nos preguntamos si el sistema eCB podría estar afectado por la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C. Una posibilidad sería que la inserción del dominante negativo HA- β Nrx1 Δ C en las sinapsis glutamatérgicas impidiera el freno

ejercido por las β Nrxns endógenas sobre la producción de eCBs. Este efecto podría resultar en una mayor producción de eCB que causara el descenso de la probabilidad de liberación detectado. Por otra parte, el dominio extracelular del mutante HA- β Nrx1 Δ C podría representar un freno adicional para la síntesis de eCBs. En este sentido, los resultados preliminares del abordaje de proteómica en sinaptosomas mediante iTRAQ apuntaron a una menor producción de eCBs y a un incremento en su degradación. Se observó una reducción en proteínas que activan la síntesis de 2-AG (mGlu₁) y un incremento en la enzima degradadora de AEA (FAAH). Por todo ello, decidimos abordar directamente si la ruta mediada por eCBs podría estar afectada en el modelo β Nrx1 Δ C mediante la determinación de los niveles de compuestos con actividad eCB en el cerebro.

En colaboración con el grupo de Rafael de la Torre, en la Universitat Pompeu Fabra (Barcelona), cuantificamos los niveles de los dos eCBs principales, 2-AG y AEA. En paralelo también analizamos otros compuestos derivados de ácidos grasos que proporcionan información complementaria de la actividad de enzimas comunes. El análisis lo realizamos en muestras de corteza, el área cerebral donde habíamos registrado el descenso en la frecuencia de mEPSCs y mIPSCs y de la que se purificaron los sinaptosomas utilizados en el experimento de proteómica. Debido a que el defecto en comportamiento social y el incremento en comportamiento repetitivo están presentes en machos y hembras del modelo β Nrx1 Δ C (figuras 34-36, 38, 42), decidimos analizar los niveles de eCBs en una cohorte de ratones de cada sexo. También incluimos muestras de machos β Nrx1 Δ C tratados con Dox, para testar si los cambios potenciales en niveles de eCBs se pueden revertir al apagar la expresión del transgén, al igual que ocurre con el fenotipo asociado a autismo (Figuras 40,41).

Para evitar alteraciones debidas al incremento post-mortem en los niveles de eCBs (Buczynski et al., 2010) se verificó que el tejido fue extraído, pesado y congelado para todos los casos en un intervalo de 2-3 minutos desde el sacrificio por dislocación. Además, para ralentizar las reacciones enzimáticas de síntesis de eCBs, todo el proceso se realizó en una cámara fría y sobre hielo.

Sorprendentemente y contrario a lo que se ha postulado, no encontramos diferencias en los niveles de eCBs entre los distintos genotipos y tratamientos en ninguna de las cohortes de animales (figura 46 A-D). Sin embargo, sí se observaron diferencias relacionadas con el sexo de los animales. Concretamente, los niveles de AEA ratones machos triplican a los hallados en hembras (Figura 46 E, F). Este efecto no se observa en 2-AG, que muestra niveles similares en ambos sexos. Debido a que los ratones β Nrx1 Δ C de ambos sexos presentan un comportamiento asociado al autismo (Figuras 38, 42) estos datos descartan que las variaciones en los niveles de AEA afecten al fenotipo de comportamiento del modelo β Nrx1 Δ C. Por lo tanto, podemos concluir que la inhibición en la de transmisión sináptica del modelo β Nrx1 Δ C no se explica por una mayor producción tónica de eCBs, aunque no podemos descartar que la señalización de la ruta esté alterada por otros mecanismos.

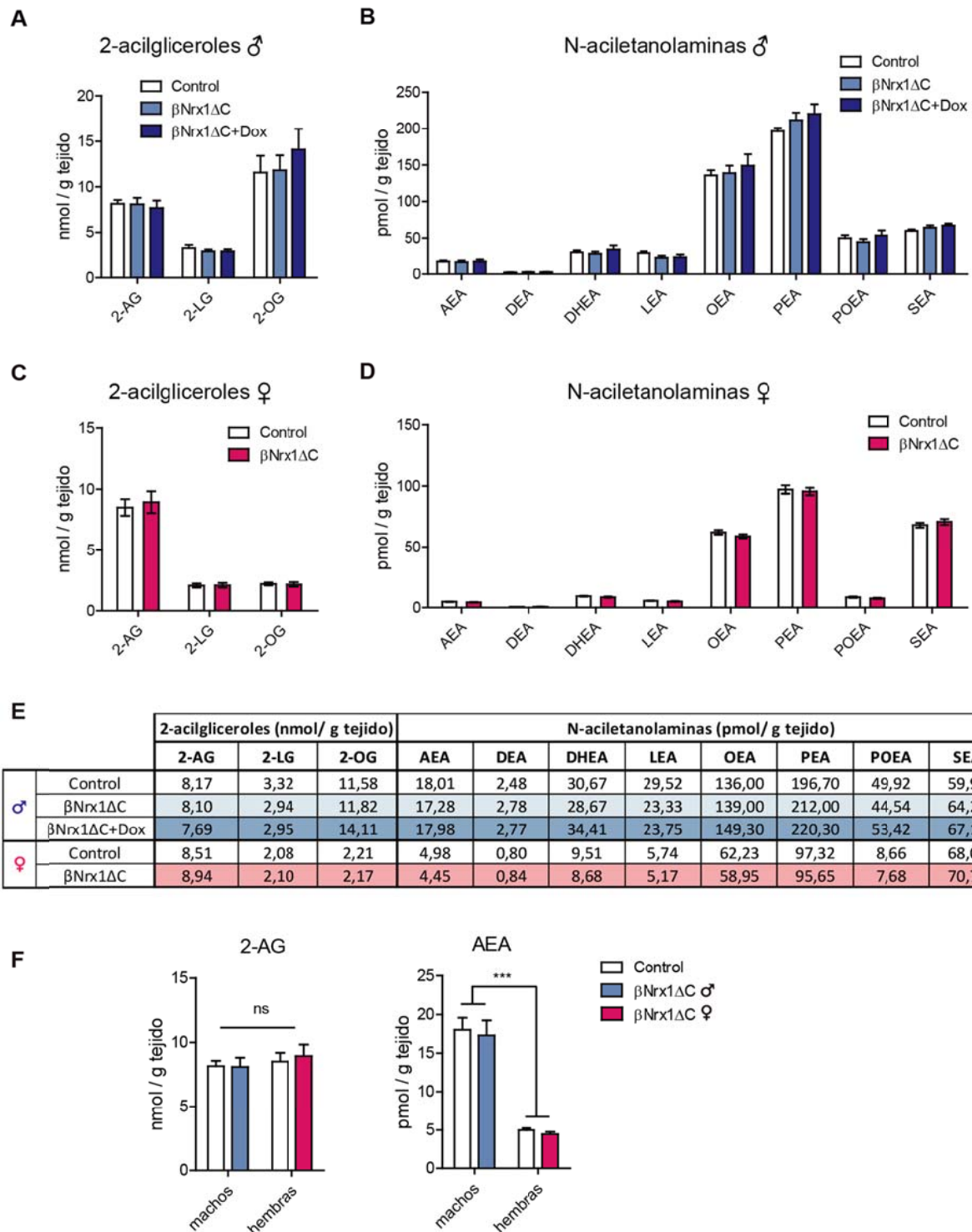


Figura 46. Cuantificación de los niveles de eCBs y compuestos relacionados en corteza de animales machos (A, B) y hembras (C, D). A, C.- Niveles de 2-AG y otros compuestos del grupo de los 2-acilgliceroles: 2-LG (2-lineoil glicerol) y 2-OG (2-oleoil glicerol). B, D.- Niveles de AEA y otros compuestos del grupo de las N-aciletanolaminas: DEA (docosatetraenoil etanolamida), DHEA (ocohexanoil etanolamina), LEA (linoleoil etanolamida), OEA (oleoil etanolamida, PEA (palmitoil etanolamida), POEA (palmitoleoil etanolamida) y SEA (estearoil etanolamida). E.-

Valores numéricos de las cuantificaciones mostradas en A-D. F.- Comparación de los niveles de 2-AG y AEA entre sexos. N=10 ratones macho de cada grupo (A, B); N=15 ratonas hembra de cada grupo (C, D). Análisis estadístico para cada compuesto: *one-way* ANOVA (A, B), *t-test* (C, D), *two-way* ANOVA y *post hoc* Bonferroni con comparaciones múltiples (F).

3.4. Análisis de cambios en la expresión génica

Numerosos estudios indican que la actividad neuronal regula complejos programas de expresión génica relacionados con la función sináptica (Benito et al., 2015; Cohen et al., 2008). Por otra parte, mutaciones en genes reguladores de la transcripción dependiente de actividad dan lugar a enfermedades neurológicas en humanos, como ocurre en el TEA (Flavell et al., 2008). Aunque no se ha descrito un papel de las Nrnx en la regulación de la expresión génica, nos preguntamos si los defectos en la transmisión sináptica observados en el ratón β Nrx1 Δ C resultan en cambios en los patrones de expresión génica. La identificación de las posibles alteraciones en la expresión génica podría suponer un paso inicial en la caracterización de los circuitos neuronales responsables del comportamiento asociado al TEA.

Para ello, realizamos un análisis masivo del perfil de expresión génica en el ratón β Nrx1 Δ C mediante el *array* GeneChip *Mouse Transcriptome Assay* 1.0 (MTA 1.0) de Affymetrix en el Servicio de Genómica del IBiS. Escogimos para su análisis el estriado dorsal, la región cerebral que muestra expresión más elevada de la proteína transgénica (figura 20) y que además recibe aferencias glutamatérgicas de regiones que también expresan el mutante, como son las cortezas cingulada, somatosensorial y motora (figura 21). Se comparó el transcriptoma de tres parejas de ratones control *wild-type* y β Nrx1 Δ C hermanos de camada, de igual edad (3 meses) y sexo (machos). Los resultados crudos se analizaron por la unidad de genómica del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (Cabimer, Sevilla).

Tras la normalización y análisis de la varianza de los datos, filtramos los cambios que superaban un *p-value* < 0.05 y los ordenamos según el valor de cambio lineal (FC, del inglés *Fold Change*). Siguiendo el diagrama de trabajo representado en la figura 47, realizamos un primer abordaje del estudio de enriquecimiento de categorías de

ontología de genes (GO) con los genes que superaron el umbral de $0.8 > FC > 1.20$. Posteriormente, los transcritos que mostraron valores de $0.6 > FC > 1.40$ procedieron a validarse mediante retrotranscripción y PCR cuantitativa (RT-qPCR) en las mismas muestras de RNA empleadas en el *array*. Por último, estos mismos genes candidatos se analizaron en una fase de replicación por RT-qPCR en muestras independientes.

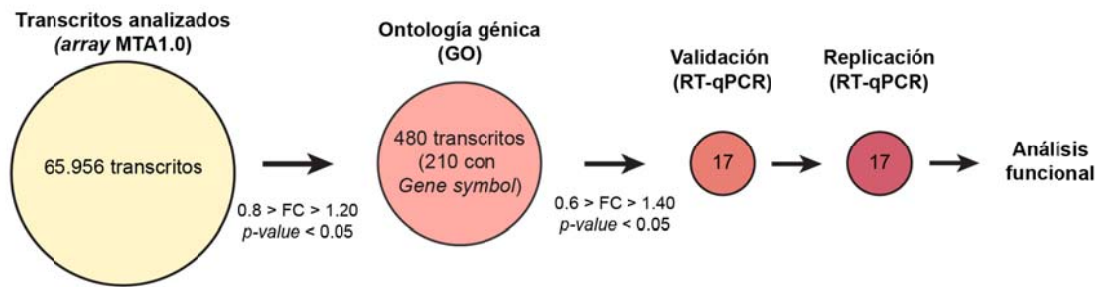


Figura 47. Diagrama de trabajo seguido para el análisis de los resultados de cambios en expresión génica obtenidos con el *array* MTA1.0 de Affymetrix. En cada situación se indican los filtros aplicados y el número de transcritos analizados.

3.4.1. Análisis de enriquecimiento ontológico de genes

Para analizar la ontología del conjunto de genes cuyo cambio lineal cumple $0.8 > FC > 1.20$ utilizamos la plataforma STRING (Szklarczyk et al., 2017), que busca asociaciones entre genes y enriquecimientos en categorías de ontología génica (GO) mediante la comparación del listado de genes de interés con el genoma de ratón. De los 480 transcritos cuyo cambio supera el umbral de $0.8 > FC > 1.20$ con $p\text{-value} < 0.05$, sólo 210 poseen una categoría GO asociada. Las categorías GO se agrupan según correspondan a procesos biológicos, funciones moleculares o componentes celulares. Encontramos un enriquecimiento en categorías correspondientes a procesos biológicos y funciones moleculares relacionados con la sinapsis, como son por ejemplo la transmisión sináptica, la regulación de señalización por glutamato, el transporte de calcio o la regulación de la exocitosis (anexo 2). Además, los cambios clasificados en categorías de componentes celulares están relacionados con la membrana plasmática y con complejos de canales iónicos. Utilizando una herramienta informática independiente que también analiza la ontología génica, GOrilla (Eden et al., 2009),

encontramos cambios muy similares que confirman los enriquecimientos ontológicos hallados con STRING (resultados no mostrados). Los resultados obtenidos de los análisis de ontología génica apoyan que el mutante de β Nrxn1 tiene un efecto sobre patrones de expresión de genes con función sináptica, que se relacionan con los defectos en liberación vesicular obtenidos *in vitro* y con los cambios electrofisiológicos observados *ex vivo*.

3.4.2. Validación y replicación de los cambios en expresión génica por RT-qPCR

El siguiente paso fue seleccionar los genes candidatos que superaban un cambio lineal más restrictivo ($0.6 > FC > 1.40$) y proceder a la validación en las mismas muestras empleadas para el *array*. Posteriormente, estos genes pasaron a la fase de replicación en muestras independientes. Para estos análisis utilizamos RT-qPCR mediante ensayos de expresión génica TaqMan ya que permite cuantificar los niveles de mRNA mensajero de un gen con una alta especificidad y precisión.

Fase de validación

De los 17 genes que cumplieron los requisitos para entrar en la fase de validación, 8 se regulan al alza y 9 a la baja. Como resultado del análisis por RT-qPCR para cada gen, encontramos que los 17 genes mostraron cambios en el mismo sentido que los detectados en el *array* y la mayoría de estos cambios fueron significativos (figura 48 A). En la tabla (figura 48 B) se comparan los resultados obtenidos mediante las dos lecturas empleadas, el *array* MTA1.0 y el experimento de validación mediante RT-qPCR. En la validación de los genes regulados al alza observamos un FC de mayor magnitud que el obtenido en el *array*. En un tono más oscuro señalamos los genes cuyo cambio se valida significativamente por RT-qPCR.

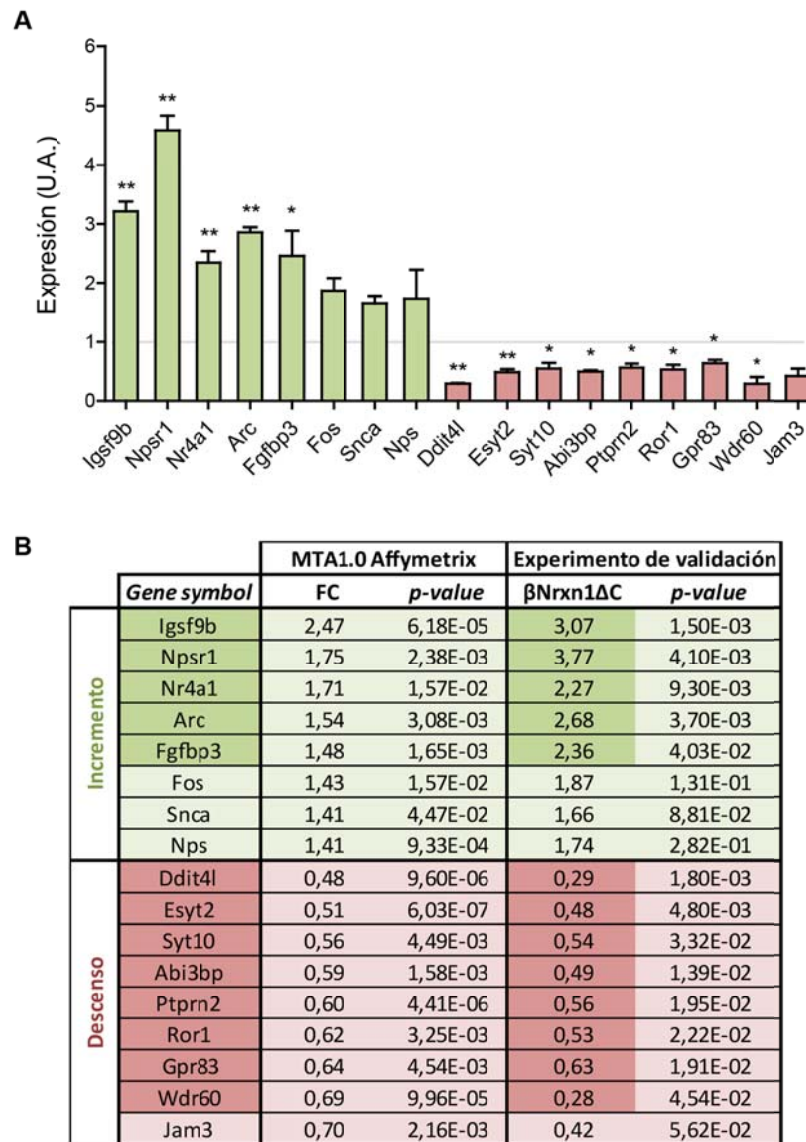


Figura 48. Experimento de validación de los genes con $0,6 > FC > 1,40$ en el *array*. A.- Resultado del experimento de validación por RT-qPCR. B.- Tabla comparativa de los datos de FC obtenidos a partir de las dos técnicas utilizadas (*array* MTA1.0 y RT-qPCR en la validación). En un color más intenso se marcan los genes que se validan significativamente mediante RT-qPCR. Análisis estadístico del experimento de validación: *t*-test. **p*-value < 0.05; ***p*-value < 0.01.

Fase de replicación

Para confirmar que los cambios de expresión génica observados no son fruto de la variabilidad individual de las muestras utilizadas, decidimos replicar el análisis de los mayores cambios de expresión génica en una cohorte independiente de animales *wild-type* y dobles transgénicos β Nrx1 Δ C. Además, para descartar falsos positivos

ocasionados por la transgénesis, decidimos incluir controles adicionales correspondientes a los ratones simples transgénicos TRE-HA- β Nrx1 Δ C y CaMKII-tTA. De este modo, comparamos los niveles de expresión de los genes candidatos en los 4 genotipos posibles.

El experimento de replicación lo realizamos con 3-6 muestras de mRNA de ratones de cada genotipo extraídas con el mismo método que las utilizadas en el *array*. Mediante el experimento de replicación (Tabla 11), la mayoría de los cambios de expresión génica que detectamos en el *array* se reprodujeron en los ratones dobles transgénicos β Nrx1 Δ C. Sin embargo, algunos genes mostraron cambios similares en ratones dobles transgénicos y en uno de los simples transgénicos. Como en los ratones simples transgénicos no se expresa el mutante de β Nrxn1, estos resultados descartan que dichos genes se vean afectados por la expresión de la proteína HA- β Nrx1 Δ C, sino que deben estar regulados por mecanismos alternativos.

Concretamente, se observó que los genes cuya expresión se reprime a mayor nivel en los ratones β Nrx1 Δ C presentaban una disminución similar en los simples transgénicos CaMKII-tTA. Además, algunos de estos genes se localizan en zonas vecinas del cromosoma 12 (*Esy1*, *Ptprn2* y *Wdr60*) (tabla 11). Por otra parte, también se observó una localización en regiones vecinas del cromosoma 9 para los genes *Igsf9b*, *Npsr1* y *Jam3*, cuya expresión en el ratón doble transgénico β Nrx1 Δ C aumenta al mismo nivel (*Npsr1*), disminuye al mismo nivel (*Jam3*) o no se ve afectada (*Igsf9b*) en el simple transgénico TRE-HA β Nrx1 Δ C. Estos datos nos hicieron sospechar de un posible efecto insercional de cada transgén. Sin embargo, existen otros genes desregulados de forma similar en el ratón β Nrx1 Δ C y en uno de los ratones simples transgénicos que se encuentran en otras regiones del genoma, como *Ddit4l*.

	Gene symbol	Experimento de Replicación				Posición genómica		
		TRE-HA- β Nrx1 Δ C	CaMKII-tTA	β Nrx1 Δ C	pvalue	cromosoma	inicio	fin
Incremento	Igsf9b	1,00	1,10	3,65	<0,0001	chr9	27299228	27334763
	Npsr1	6,34	2,29	5,57	0,0059	chr9	24097996	24316398
	Nr4a1	1,19	1,30	1,19	0,8197	chr15	101266846	101274795
	Arc	1,47	1,27	1,54	0,3474	chr15	74669081	74672570
	Fgfbp3	0,86	1,84	2,03	0,0001	chr19	36917550	36919615
	Fos	1,17	1,35	2,21	0,4258	chr12	85473890	85477273
	Snca	0,80	1,00	0,91	0,9747	chr6	60731573	60829855
	Nps	1,35	1,42	1,43	0,6158	chr7	135268619	135272942
Descenso	Ddit4l	1,04	0,31	0,34	<0,0001	chr3	137621612	137628333
	Esy2	0,84	0,47	0,50	<0,0001	chr12	116281222	116391050
	Syt10	1,44	0,69	0,75	0,0038	chr15	89782393	89841860
	Aoi3bp	1,03	0,60	0,61	0,0007	chr16	56477846	56690135
	P:prn2	0,73	0,51	0,50	0,0003	chr12	116485720	117278167
	Ror1	1,31	0,76	0,62	0,012	chr4	100095791	100444765
	Gpr83	1,26	0,82	0,88	0,002	chr9	14860210	14870789
	Wdr60	0,77	0,49	0,71	0,457	chr12	116207050	116263025
	Jam3	0,53	1,07	0,54	<0,0001	chr9	27097384	27155421

Tabla 11. Experimento de replicación y posición genómica de los genes con $0.6 > FC > 1.40$ en el *array*. En la columna correspondiente al experimento de replicación se marcan en un color más intenso las celdas cuyo cambio de expresión por RT-qPCR es estadísticamente significativo (p -value < 0.05). Análisis estadístico: *One-way* ANOVA y *post hoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples. En la columna de posición genómica se resaltan en un color más intenso las posiciones cercanas entre sí, concentradas en los cromosomas 9 y 12 murinos. N=3-6 muestras de cada grupo. Análisis estadístico: *one-way* ANOVA y *post hoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples.

3.5. Análisis de la localización genómica del sitio de inserción de los transgenes TRE-HA- β Nrx1 Δ C y CaMKII-tTA

Debido a la sospecha de que la expresión génica de algunos transcritos pudiera estar afectada por un efecto insercional, decidimos analizar el sitio de integración en el genoma del ratón de los transgenes TRE-HA- β Nrx1 Δ C y CaMKII-tTA del modelo β Nrx1 Δ C. Para ello establecimos una colaboración con el grupo de Sergi Beltrán Agulló y Sophia Derdak del Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica - Centre de Regulació Genòmica (CNAG-CRG) de Barcelona.

En el CNAG-CRG se contruyó una librería genómica a partir de una fragmentación al azar del DNA genómico del ratón doble transgénico β Nrx1 Δ C. Esta librería contiene subclones con diferentes fragmentos del DNA genómico, que se secuenciaron al azar hasta generar una cantidad redundante y suficiente de secuencias de 125 pares de bases (bp). Mediante herramientas bioinformáticas se ensamblaron segmentos de subclones solapantes, llamados *contigs*. Posteriormente, se emprendió una búsqueda de las secuencias de los transgenes TRE-HA- β Nrx1 Δ C y CaMKII-tTA basada en la localización de fragmentos que compartieran secuencias del genoma de ratón y de cada uno de los transgenes. Estos fragmentos se alinearon con el genoma de referencia del ratón para identificar las regiones cromosómicas adyacentes.

3.5.1. Localización genómica del transgén CaMKII-tTA.

Resultados preliminares localizan la inserción del transgén CaMKII-tTA en el cromosoma 12, alrededor de la posición 115.372.400. En este cromosoma se encuentran algunos genes con expresión alterada por la presencia de dicho transgén, como *Esyt2*, *Ptprn2* y *Wdr60*. Por lo tanto, representa un indicio de que la inserción de CaMKII-tTA genera cambios insercionales que afectan la expresión de genes cercanos.

3.5.2 Localización genómica del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C

Los resultados del análisis de secuenciación masiva indicaron la inserción del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C entre las bases 27.145.790 y 27.146.865 del cromosoma 9. Esta región corresponde al primer intrón del gen *Jam3*, que se encuentra inhibido en dicho ratón transgénico. La lectura del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C es en sentido contrario a la de *Jam3*, codificado por la hebra complementaria del DNA.

Para confirmar el sitio de inserción realizamos secuenciaciones por el método Sanger, diseñando para ello parejas de oligonucleótidos que hibridasen en los extremos del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C y en diferentes puntos del primer intrón de *Jam3*. Mediante esta aproximación fuimos capaces de amplificar y secuenciar fragmentos de DNA que solapaban la secuencia genómica con la del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C (Secuencias en

Anexos 3.1 y 3.2). Con estos resultados hemos validado y refinado la localización de la inserción de dicho transgén entre las posiciones chr9: 27.145.793 y chr9: 27.155.222, que efectivamente se encuentran dentro del primer intrón del gen *Jam3* (figura 49). Además, hemos detectado la deleción de 9.432bp en la secuencia del intrón comprendida entre estas posiciones, donde se han insertado las 2.311bp del transgén. La secuencia del transgén se encuentra flanqueada por dos inserciones adicionales. La inserción 5' al transgén corresponde a un fragmento de 41bp del promotor de *Jam3* que ha sido duplicada, ya que confirmamos la localización en su posición original. La inserción 3' al transgén corresponde a una secuencia de 35bp de la región codificante del propio transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C en sentido inverso.

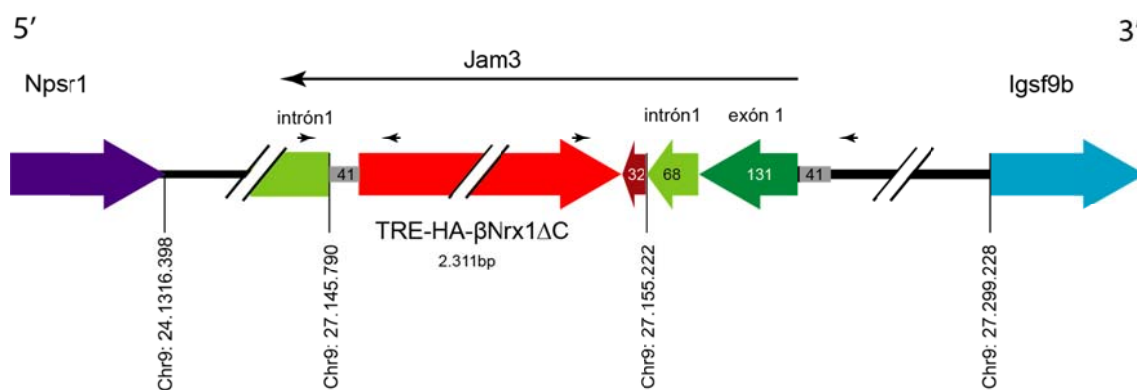


Figura 49. Diagrama explicativo de la inserción del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C en el primer intrón del gen *Jam3*. El sentido de la flecha simboliza el sentido de transcripción de cada gen. El transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C (rojo) se ha insertado dentro del intrón 1 de *Jam3* (verde claro). Un fragmento de 41bp de la región promotora de *Jam3* (gris) se ha duplicado e insertado en el extremo 5' del transgén. 32bp del propio transgén se han duplicado e insertado en sentido inverso en el extremo 3' del transgén (marrón). Los segmentos están dibujados a escala. Se señala la posición cromosómica de los puntos que flanquean la deleción de 9.432bp del intrón 1 de *Jam3*, así como los extremos de los genes adyacentes *Npsr1* (lila) e *lgsf9b* (azul). Las dos parejas de flechas negras pequeñas indican las secuencias de hibridación de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación y secuenciación por Sanger. En la figura aparece una única copia de TRE-HA- β Nrx1 Δ C pero se desconoce el número de copias insertadas del transgén.

La inserción del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C en el primer intrón de *Jam3* podría impedir la expresión de *Jam3* en el alelo afectado. Este hecho explicaría la reducción de aproximadamente el 50% de mRNA de *Jam3* que presenta el ratón simple transgénico TRE-HA- β Nrx1 Δ C (tabla 11).

Además, la inserción de TRE-HA- β Nrx1 Δ C se sitúa unas 150 Kb 5' a la secuencia de *Igsf9b* y a casi 3Mb 3' al gen *Npsr1*, por lo que la expresión incrementada de estos genes en el ratón β Nrx1 Δ C podría explicarse por un efecto insercional del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C. En el caso del gen *Npsr1*, el mecanismo parece puramente insercional debido a que su expresión se aumenta de forma similar en los ratones simples transgénicos TRE-HA- β Nrx1 Δ C y en los ratones β Nrx1 Δ C. Sin embargo, la sobreexpresión del gen *Igsf9b* ocurre solamente en el ratón β Nrx1 Δ C.

3.5.3 *Igsf9b* (Immunoglobulin superfamily member 9B)

El mRNA de *Igsf9b* se regula al alza en los ratones dobles transgénicos β Nrx1 Δ C y no en los ratones simples transgénicos (figura 50 A, B). La localización vecina de *Igsf9b* al sitio de inserción del transgén HA- β Nrx1 Δ C nos sugirió la posibilidad de que la activación del promotor TRE por el factor tTA en los ratones dobles transgénicos, que hace que el mutante HA- β Nrx1 Δ C se transcriba, podría causar como efecto colateral un incremento de transcripción del gen adyacente *Igsf9b*. En experimentos de RT-qPCR detectamos un aumento en la expresión de *Igsf9b* en regiones del cerebro del ratón β Nrx1 Δ C, como estriado y corteza, donde ocurre la expresión dependiente de tTA del mutante de β Nrxn1 (figura 50 A-C). Esta expresión depende de la activación transcripcional de tTA, ya que se inhibe con Dox (figura 50 D). De igual forma, en experimentos de *western blot* detectamos un aumento en los niveles de proteína *Igsf9b* en corteza y estriado, pero no en cerebelo, cuyo valor recupera los niveles normales en presencia de Dox (figura 50 F). En muestras de sinaptosomas corticales de ratones β Nrx1 Δ C se observó una tendencia no significativa al incremento de *Igsf9b* (figura 50 G). Por otra parte, la sobreexpresión de HA- β Nrx1 Δ C mediante infección lentiviral en cultivos de neuronas de hipocampo no aumentó los niveles de mRNA de

Igsf9b in vitro (figura 50 E), indicando que la sobreexpresión de *Igsf9b* en el ratón β Nrx1 Δ C es independiente de los niveles de expresión de HA- β Nrx1 Δ C.

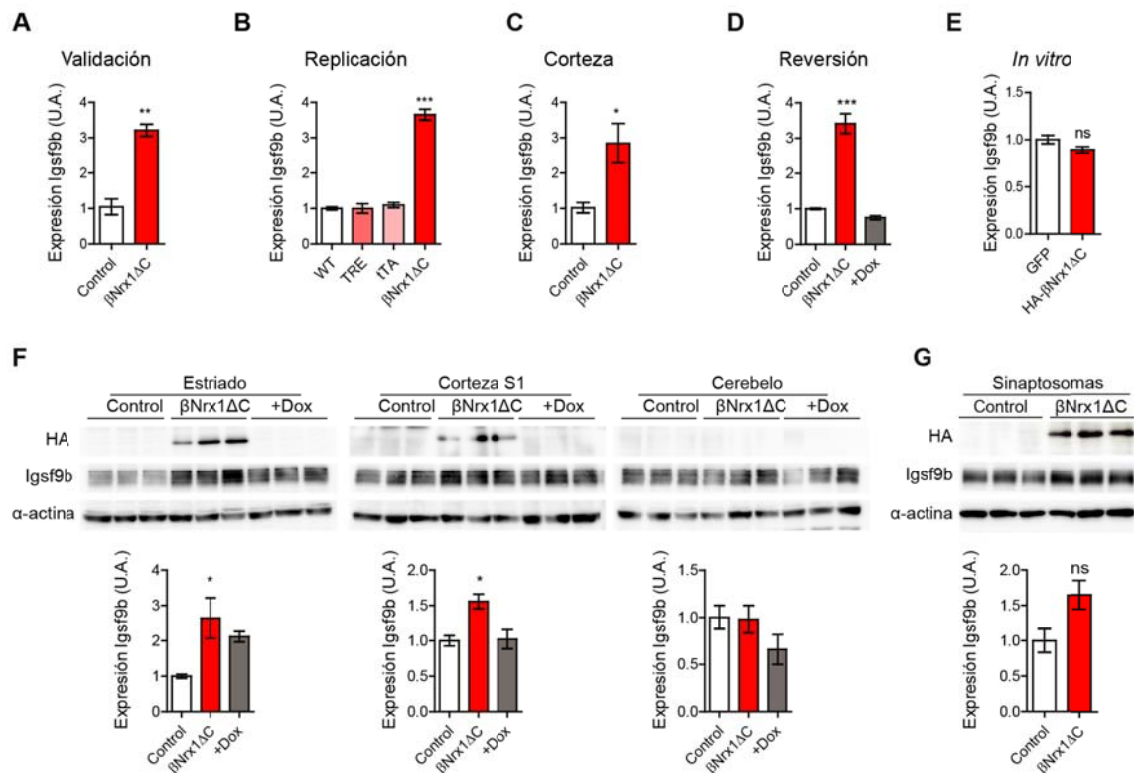


Figura 50. Análisis de la expresión de *Igsf9b* a nivel de mRNA mediante RT-qPCR (A-E) y de proteína mediante *western-blot* (F, G). A.- Validación por RT-qPCR en las muestras del *array* (estriado). B.- Experimento de replicación en estriado de ratones de los cuatro genotipos de la línea β Nrx1 Δ C. WT: *wild-type*; TRE: simples transgénicos TRE-HA- β Nrx1 Δ C; tTA: simples transgénicos CamKII-tTA. C.- Datos de expresión de *Igsf9b* en muestras de corteza. D.- Experimento de reversión con Dox en muestras de estriado. E.- Niveles de *Igsf9b* in vitro en neuronas infectadas con lentivirus que expresan GFP o HA- β Nrx1 Δ C. F.- Niveles de proteína *Igsf9b* en corteza, estriado y cerebelo. Debajo de cada *western blot* se representa el promedio de la cuantificación de la expresión de *Igsf9b* normalizada a actina. G.- Análisis de *Igsf9b* en tres purificaciones independientes de sinaptosomas corticales de animales control y β Nrx1 Δ C. Cuantificación de *Igsf9b* relativa a actina, se muestra el promedio de las tres purificaciones. N=3 (A, C-G); N=3-6 (B). Análisis estadístico: *t-student* (A, C, G); *one-way ANOVA* y *post hoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples (B, D, F). * *p-value* <0.05; ** *p-value* <0.01; *** *p-value* <0.001. Todas las barras de error son SEM.

En consecuencia a los resultados obtenidos a la expresión de *Igsf9b*, podemos afirmar que el incremento de la transcripción del gen *Igsf9b* en ratones β Nrx1 Δ C se debe a una co-activación transcripcional debida a la presencia del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C en regiones cromosómicas adyacentes.

El gen *Igsf9b* codifica una proteína transmembrana que media adhesiones homofílicas transinápticas en colaboración con NL2 (Woo et al., 2013). Se ha demostrado que la reducción de los niveles de *Igsf9b* mediante RNA de interferencia provoca una reducción de la frecuencia de mIPSCs, mientras que las mEPSCs se mantienen inalteradas (Woo et al., 2013). Aunque el efecto de la sobreexpresión de *Igsf9b* no se ha documentado, el incremento de *Igsf9b* en el ratón β Nrx1 Δ C debería provocar un incremento en la frecuencia de mIPSCs en las neuronas piramidales corticales. Sin embargo, nuestros datos muestran lo contrario, un descenso de la frecuencia de mIPSCs en las neuronas piramidales de la corteza (figura 29). Además, los niveles de NL2 no se afectan en el ratón β Nrx1 Δ C (figura 43). Por ello, podríamos descartar que la expresión accidental de *Igsf9b* afecte la transmisión sináptica en el ratón β Nrx1 Δ C

3.5.4 *Ddit4l* (DNA damage inducible transcript 4 like)

Ddit4l codifica un inhibidor de la ruta mTOR (*mechanistic Target Of Rapamycin*) (Corradetti et al., 2005). En las sinapsis, la activación de la ruta de mTOR promueve la síntesis proteica local, mecanismo sumamente importante en la regulación de la plasticidad sináptica (Kindler et al., 2012) e inhibe la eliminación de sinapsis por autofagia (Tang et al., 2014). Se han detectado mutaciones en pacientes con TEA sindrómico que resultan en la activación constitutiva de la vía mTOR y por ello se ha propuesto este mecanismo como posible nodo en el autismo (Bourgeron, 2009; Lipton et al., 2014).

Como hemos mostrado en la figura 48 y en la tabla 11, el descenso de *Ddit4l* en el ratón β Nrx1 Δ C observado en el *array* se valida por RT-qPCR en las mismas muestras (figura 51 A) y se replica en una población independiente de ratones dobles transgénicos en muestras de estriado y de corteza (figura 51 B y C). Sin embargo, el descenso en los niveles de mRNA de *Ddit4l* también se observa en muestras de los

ratones simples transgénicos CamKII-tTA, lo cual nos hizo dudar de su significancia biológica, puesto que estos ratones no presentan expresión de HA- β Nrx1 Δ C.

En cualquier caso, sería posible que la inhibición en los niveles de mRNA de *Ddit4l* que ocurre en los ratones CamKII-tTA produjera una desinhibición de la ruta de mTOR y contribuyera así a explicar el fenotipo asociado al TEA del ratón β Nrx1 Δ C. Para analizar esta posibilidad realizamos experimentos adicionales por RT-qPCR y *western blot*. En contra de esta hipótesis hallamos que los niveles del mRNA de *Ddit4l* se mantenían reducidos en ratones β Nrx1 Δ C en presencia de Dox (figura 51 D), mientras que el fenotipo similar al autismo sí se revirtió con dicho tratamiento (figuras 40,41 comportamiento). Posteriormente estudiamos los niveles de la proteína Ddit4l y el estado de la activación de la ruta mTOR en muestras de estriado de ratones control y ratones β Nrx1 Δ C sin tratar o tratados con Dox. En este experimento encontramos que la inhibición de la expresión génica de *Ddit4l* no se traduce en cambios a nivel proteico, ya que la proteína Ddit4l no mostró cambios entre las diferentes condiciones (figura 51 F). En concordancia con este resultado, la activación de la ruta mTOR, evaluada mediante las fosforilaciones que promueve sobre la proteína S6 (Serinas 235, 236, 240, 244), tampoco se encontró afectada (figura 51 F).

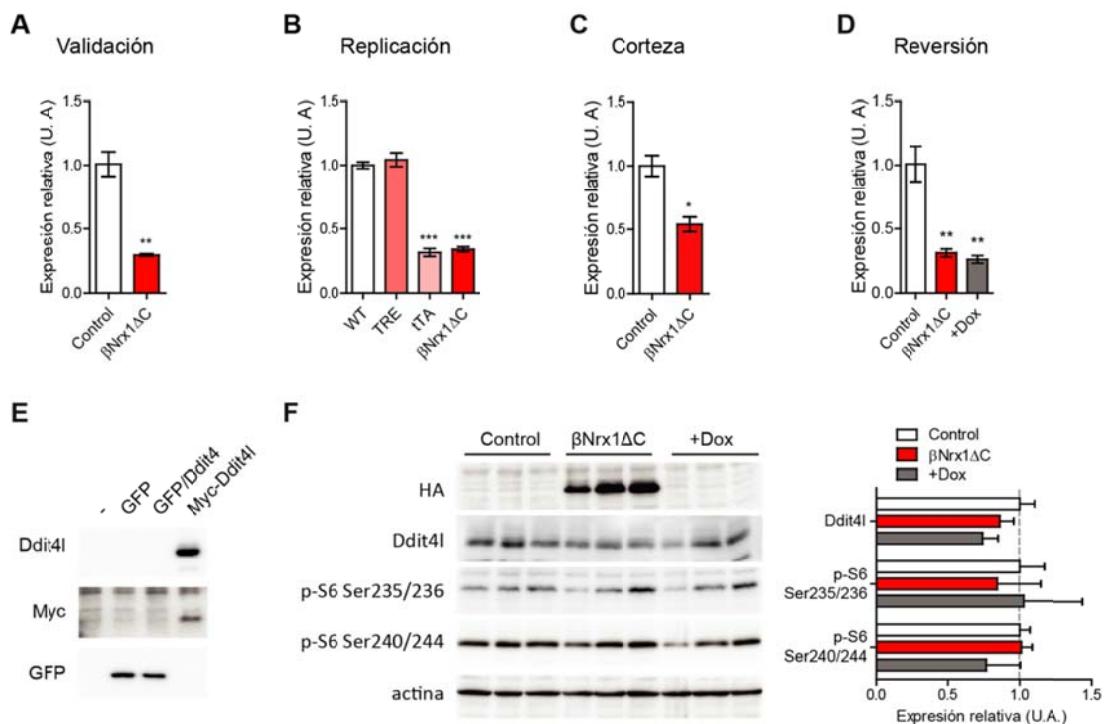


Figura 51. Análisis de la expresión de *Ddit4l* a nivel de mRNA mediante RT-qPCR (A-D) y de proteína por *western-blot* (F). A.- Validación en las muestras del *array* (estriado). B.- Experimento de replicación en estriado de ratones de los cuatro genotipos de la línea β Nrx1 Δ C. WT: *wild-type*; TRE: simples transgénicos TRE-HA- β Nrx1 Δ C; tTA: simples transgénicos CamKII-tTA. C.- Análisis en la corteza somatosensorial. D.- Experimento de reversión con Dox. E.- Evaluación de la especificidad del anticuerpo anti-*Ddit4l* en lisados de células HEK293T transfectadas con Myc-*Ddit4l*. Como controles negativos se utilizan células sin transfectar y transfectadas con GFP solo o junto con el homólogo *Ddit4*. F.- Análisis de los niveles de *Ddit4l* y de las fosforilaciones de la proteína S6 (Ser-235, 236, 240, 244) como lectura de la activación de la ruta mTOR en muestras de estriado de ratones control, β Nrx1 Δ C y β Nrx1 Δ C tratados con Dox (+Dox). A la derecha se muestra la cuantificación del promedio de expresión normalizada a actina en las tres réplicas de cada grupo. N=3 (A, F); N=3-6 (B); N=2-3 (C, D). Análisis estadístico: *t-student* (A, C); *one-way* ANOVA y *post hoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples (B, D). * *p-value* <0.05, ** *p-value* <0.01; *** *p-value* <0.001. Todas las barras de error son SEM.

Por estas razones, parece probable que la inhibición de la transcripción de *Ddit4l* (cromosoma 3) en ratones CamKII-tTA no se deba a la cercanía del sitio de inserción del transgén (cromosoma 12), sino que resulte como consecuencia indirecta de la transgénesis. Por otro lado, los niveles de proteína *Ddit4l* y la ruta de activación de mTOR no están afectados en el ratón β Nrx1 Δ C. Una consecuencia adicional de estos experimentos es que descartan un papel de la activación de mTOR en el fenotipo asociado a autismo del ratón β Nrx1 Δ C.

En conjunto, basándonos en el análisis de los posibles efectos derivados de los cambios de expresión génica de mayor magnitud (*Igsf9b* y *Ddit4l*), podemos concluir que no hemos detectado consecuencias fisiológicas evidentes derivadas de la transgénesis. Además, los ratones simples transgénicos habían formado parte de las poblaciones de ratones control en los experimentos de comportamiento, sin haber observado cambios de comportamiento con respecto a los ratones *wild-type*. Por lo tanto, la desregulación de niveles de mRNA por mecanismos insercionales no parece que conlleve cambios funcionales en los ratones β Nrx1 Δ C.

3.6. Re-clasificación de los cambios de expresión génica

Los datos de la localización de los transgenes en el genoma obtenidos mediante técnicas de secuenciación masiva y la validación funcional de genes candidatos nos permitieron detectar falsos positivos y re-clasificar los cambios de expresión génica observados en el ratón β Nrx1 Δ C:

Falsos positivos

- Genes afectados directamente por su posición con respecto a la inserción del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C: *Igsf9b*, *Npsr1*, *Jam3* (Tabla 12).
- Genes afectados directamente por la inserción del transgén CaMKII-tTA: *Esyt2*, *Ptprn2*, *Wdr60*. Estos genes se sitúan cercanos al lugar de inserción de dicho transgén, por lo que su secuencia o expresión puede verse interrumpida (Tabla 12).
- Genes afectados indirectamente por la inserción del transgén CaMKII-tTA: *Fgfbp3*, *Ddit4l*, *Syt10*, *Abi3bp*. Son genes cuya expresión se modula de igual manera en los ratones CaMKII-tTA que en los doble transgénicos, pero cuya localización en el genoma no coincide con la inserción del transgén (Tabla 12).

	Gene symbol	Experimento de Replicación				Posición genómica		
		TRE-HA- β Nrx1 Δ C	CaMKII-tTA	β Nrx1 Δ C	p-value	cromosoma	inicio	fin
Genes afectados directamente por TRE-HA-βNrx1ΔC								
I	<i>Igsf9b</i>	1,00	1,10	3,65	< 0.0001	chr9	27299228	27334763
	<i>Npsr1</i>	6,34	2,29	5,57	0,0059	chr9	24097996	24316398
D	<i>Jam3</i>	0,53	1,07	0,54	< 0.0001	chr9	27097384	27155421
Genes afectados directamente por CaMKII-tTA								
	<i>Esyt2</i>	0,84	0,47	0,50	< 0.0001	chr12	116281222	116391050
D	<i>Ptprn2</i>	0,73	0,51	0,50	0,0003	chr12	116485720	117278167
	<i>Wdr60</i>	0,77	0,49	0,71	0,457	chr12	116207050	116263025
Genes afectados indirectamente por CaMKII-tTA								
I	<i>Fgfbp3</i>	0,86	1,84	2,03	0,0001	chr19	36917550	36919615
	<i>Ddit4l</i>	1,04	0,31	0,34	< 0.0001	chr3	137621612	137628333
D	<i>Syt10</i>	1,44	0,69	0,75	0,0038	chr15	89782393	89841860
	<i>Abi3bp</i>	1,03	0,60	0,61	0,0007	chr16	56477846	56690135

Tabla 12. Re-clasificación de los genes falsos positivos. Los cambios de expresión son debidos directa o indirectamente a la inserción de los transgenes TRE-HA- β Nrx1 Δ C o CaMKII-tTA. Nótese que los genes directamente afectados tienen localización cercana a la inserción del transgén (chr9 o chr12). Se representan en verde los genes con expresión incrementada (I) y en rojo los descensos en expresión génica (D). En color más intenso se representan los cambios significativos por qPCR. N=3-6 muestras de cada grupo. Análisis estadístico: *one-way* ANOVA y *post hoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples.

Genes alterados por la expresión de la proteína HA- β Nrx1 Δ C

Genes no afectados por la inserción de los transgenes y cuyo cambio se ha reproducido al menos parcialmente en alguno de los experimentos de validación y/o replicación: *Nr4a1*, *Arc*, *Fos*, *Snca*, *Nps*, *Ror1* y *Gpr83* (Tabla 13).

	<i>Gene symbol</i>	MTA1.0 Affymetrix		Validación		Experimento de Replicación			
		β Nrxn1 Δ C	<i>p-value</i>	β Nrxn1 Δ C	<i>p-value</i>	TRE-HA- β Nrx1 Δ C	CaMKII-tTA	β Nrx1 Δ C	<i>p-value</i>
I	<i>Nr4a1</i>	1,71	1,57E-02	2,27	9,30E-03	1,19	1,30	1,19	0,8197
	<i>Arc</i>	1,54	3,08E-03	2,68	3,70E-03	1,47	1,27	1,54	0,3474
	<i>Fos</i>	1,43	1,57E-02	1,87	1,31E-01	1,17	1,35	2,21	0,4258
	<i>Snca</i>	1,41	4,47E-02	1,66	8,81E-02	0,80	1,00	0,91	0,9747
	<i>Nps</i>	1,41	9,33E-04	1,74	2,82E-01	1,35	1,42	1,43	0,6158
D	<i>Ror1</i>	0,62	3,25E-03	0,53	2,22E-02	1,31	0,76	0,62	0,012
	<i>Gpr83</i>	0,64	4,54E-03	0,63	1,91E-02	1,26	0,82	0,88	0,002

Tabla 13. Genes regulados por la proteína HA- β Nrx1 Δ C. Los cambios de expresión no se afectan por la presencia de los transgenes TRE-HA- β Nrx1 Δ C o CaMKII-tTA. Se comparan los resultados obtenidos en el *array* MTA1.0, en la validación por RT-qPCR y en el experimento de replicación por RT-qPCR respecto a ratones *wild-type*. En un color más intenso se señalan los cambios significativos por RT-qPCR. N=3-6 muestras de cada grupo. Análisis estadístico: *t-test* en la validación; *one-way* ANOVA y *post hoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples en la replicación.

3.7. Genes regulados por actividad sináptica: *Nr4a1*, *Arc* y *Fos*

Una vez descartados los falsos positivos, nos centramos en los cambios génicos debidos a la expresión de la proteína HA- β Nrx1 Δ C. Entre ellos se encuentra un

subgrupo de genes con expresión incrementada en el ratón β Nrx1 Δ C que se agrupan en la categoría de genes de expresión inmediata temprana o IEG (de sus siglas en inglés *Immediate-early genes*). Estos genes se inducen rápidamente y de manera transitoria en respuesta a un incremento en los niveles de calcio tras la transmisión sináptica y su inducción no requiere la síntesis proteica de factores adicionales (West et al., 2011). Son los genes *Fos*, *Nr4a1* y *Arc*.

El gen *Fos* es el primer IEG que se describió. La proteína que codifica (*Fos*) es miembro de la familia AP-1 de factores de transcripción (de sus siglas en inglés *activator protein 1*). *Fos* forma heterodímeros con otros miembros de la familia para formar factores de transcripción funcionales, que activan la transcripción de genes de respuesta a actividad más tardía (Minatohara et al., 2016). La familia AP-1 es de gran importancia para la regulación génica, ya que aproximadamente un tercio de los genes del genoma humano contienen el sitio consenso de AP-1 en su promotor.

Nr4a1 (*Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1*) codifica un receptor nuclear cuyo ligando es desconocido. Juega un papel importante en la modificación sináptica inducida por actividad y actúa como neuroprotector. Está involucrado en la eliminación y formación de espinas dendríticas, autofagia y regulación de la expresión de otros genes mediante su actividad como factor transcripcional (J. Chen, Yu, Fu, & Li, 2014).

Arc o *Arg3.1* (*activity regulated cytoskeletal-associated protein*) codifica una proteína de interacción con el citoesqueleto cuyo papel es acoplar la actividad neuronal con la plasticidad sináptica. Así, está involucrada en procesos de potenciación a largo plazo o LTP (de sus siglas en inglés *Long Term Potentiation*), donde regula el citoesqueleto de actina y la remodelación de las espinas dendríticas. También juega un papel importante en la depresión a largo plazo o LTD (*Long Term Depression*), ya que induce la endocitosis de receptores de glutamato tipo AMPA (Chowdhury et al., 2006; J. D. Shepherd et al., 2006; Verde et al., 2006). Como consecuencia a estos procesos *Arc* controla la homeostasis de la sinapsis (Korb et al., 2011).

Según los datos obtenidos en el array los genes regulados por actividad *Arc*, *Nr4a1* y *Fos* están sobreexpresados en el estriado de los ratones β Nrx1 Δ C y tienen una

tendencia al alza en la replicación por RT-qPCR utilizando muestras independientes de RNA. La expresión de dichos genes se incrementa con la actividad neuronal, por lo que su inducción sugeriría una mayor actividad sináptica en el estriado del ratón β Nrx1 Δ C. El hecho de que la replicación no alcance significancia estadística podría ser debido a que sin una estimulación específica los niveles basales de mRNA de estos genes son bajos y se localizan en células dispersas. Por ello, mediante la extracción de mRNA del estriado completo podemos estar diluyendo posibles cambios existentes en circuitos o tipos celulares concretos y que esto provoque una mayor variabilidad entre las muestras que empaña la significancia estadística. Estos resultados merecen confirmarse por pruebas alternativas en regiones cerebrales del ratón β Nrx1 Δ C.

El incremento observado en transcritos de los genes regulados por actividad *Arc*, *Nr4a1* y *Fos* en el modelo β Nrx1 Δ C indican que la expresión del mutante de β Nrxn1 tiene consecuencias fisiológicas en la actividad de circuitos neuronales, que una vez identificados, pueden proporcionar el correlato neuronal responsable del comportamiento asociado al autismo.

4. Circuitos sinápticos implicados en el fenotipo relacionado con el autismo en el modelo β Nrx1 Δ C

Como hemos mostrado en apartados anteriores de esta Tesis, la disfunción postnatal de β Nrxns en regiones del prosencéfalo conduce a cambios en la actividad del circuito sináptico y a síntomas asociados al TEA. Debido a que la expresión del mutante de β Nrxn1 ocurre en regiones concretas, la caracterización de los circuitos neuronales afectados puede llevar a identificar los sustratos neuronales responsables del comportamiento asociado al autismo. Para ello, decidimos desarrollar abordajes a diferentes niveles. Primero, realizamos un análisis de los ligandos concretos con los que interacciona el mutante de β Nrxn1 mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. Posteriormente, evaluamos la actividad de regiones cerebrales candidatas posiblemente responsables de los déficits en el comportamiento asociado al TEA. Para ello realizamos registros de electrofisiología *in vivo* en ratones que realizaban pruebas de interacción social. Nuestro último objetivo fue implementar estrategias para diseccionar la función de β Nrxns en circuitos específicos sobre el comportamiento asociado al autismo. Para ello, expresamos el dominante negativo HA- β Nrx1 Δ C mediante inyección lentiviral local por estereotaxia, para posteriormente evaluar el fenotipo de comportamiento de los animales.

4.1. Interacción de ligandos sinápticos con el mutante HA- β Nrx1 Δ C

Como hemos explicado en la introducción de esta Tesis, la interacción de isoformas de Nrxns con ligandos postsinápticos depende de eventos de *splicing* alternativo en el dominio extracelular. El mutante de β Nrxn1 que expresa el ratón β Nrx1 Δ C carece del inserto AS4. Por lo tanto, nos esperaríamos que mediara interacciones con ligandos endógenos de β Nrxn1 AS4-. Existen numerosos trabajos que analizan el código de unión transináptico de Nrxns mediante el uso de proteínas recombinantes. Además, estudios de *Surface plasmon resonance*, técnica que mide la afinidad de unión a proteínas de membrana dispuestas sobre un sensor mediante métodos ópticos, han descrito la afinidad de unión de β Nrxn1 con las diferentes NLs. En conjunto, estos

estudios coinciden en la existencia de una unión preferencial de NL1 con β Nrxns AS4-, mientras que NL2, NL3 y NL4 presentan una afinidad más reducida por dicha isoforma (Comoletti et al., 2006; Koehnke et al., 2010). También se ha reportado la importancia del *splicing* alternativo AS4 en la unión con otros ligandos de Nrxns diferentes de NLS. Isoformas Nrxns AS4- interaccionan con LRRTMs, especialmente con LRRTM1 y LRRTM2, mientras que isoformas A4+ se unen a Cbln1/GluR2 δ (de Wit et al., 2009; Ko et al., 2009; Uemura et al., 2010).

Con el objeto de conocer los ligandos sinápticos afectados por la disfunción de β Nrxns en el modelo β Nrx1 Δ C analizamos las uniones transinápticas mediadas por el mutante de β Nrxn1. Como ya hemos mencionado, la construcción HA- β Nrx1 Δ C se diseñó de tal manera que pudiera mediar uniones transinápticas a través del dominio extracelular pero que al carecer de la cola citoplasmática no pudiera transducir señales en el compartimento presináptico. Además, nuestros resultados previos en experimentos de co-cultivo demuestran que el mutante HA- β Nrx1 Δ C puede interaccionar con ligandos postsinápticos *in vitro* (figura 14). Estos experimentos validaron nuestra aproximación en cultivo y por ello decidimos analizar en profundidad los complejos asociados al mutante de β Nrxn1 *in vivo*.

4.1.1. Análisis de los ligandos sinápticos asociados a HA- β Nrx1 Δ C

En una primera fase, decidimos emprender una aproximación de ligandos candidatos. Para ello, realizamos ensayos de inmunoprecipitación (IP) en lisados de cerebro de ratones β Nrx1 Δ C empleando anticuerpos contra la etiqueta HA, presente sólo en la proteína exógena (figura 52). Posteriormente, se analizó la presencia de ligandos candidatos en dichos inmunoprecipitados. Debido a que el mutante HA- β Nrx1 Δ C carece del inserto AS4, las principales proteínas candidatas a formar complejos con ella son NL1, NL2, NL3 y LRRTMs (Ko et al., 2009; Koehnke et al., 2010; Traunmüller et al., 2016). Los anticuerpos que disponemos contra dichas proteínas son específicos y no existen reacciones cruzadas entre ellos, como demostramos en experimentos de sobreexpresión de cada una de las proteínas en células HEK293T (figura 53).

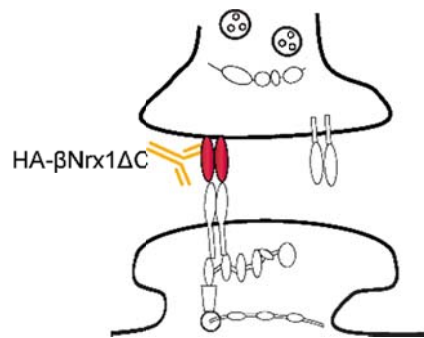


Figura 52. Representación esquemática del experimento de IP de HA-βNrx1ΔC. Se muestra la localización presináptica del mutante HA-βNrx1ΔC, marcado en rojo.

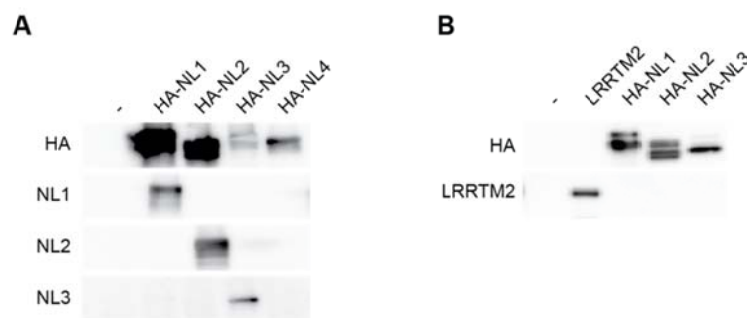


Figura 53. Selectividad de los anticuerpos que detectan proteínas de adhesión postsinápticas. Células HEK293T se transfectaron con construcciones de NL marcadas con la etiqueta HA (A) o con LRRTM2 (B) y se analizaron por *western blot* con los anticuerpos indicados a la izquierda de cada imagen.

Para poner a punto esta aproximación, realizamos primero un experimento piloto en lisados de corteza de animales βNrx1ΔC, utilizando cantidades crecientes del anticuerpo anti-HA, así como diferentes cantidades de resina para aislar los inmunocomplejos. Como control negativo de la IP utilizamos también lisados de corteza de ratones control, que no expresan la proteína transgénica, para identificar uniones inespecíficas del lisado al anticuerpo o a la resina. Mediante *western blot* analizamos la presencia de la proteína HA-βNrx1ΔC purificada en el precipitado, así como la depleción de la misma en el material desechado tras la IP (sobrenadante o SN). Como se puede observar en la figura 54, el mutante HA-βNrx1ΔC se purificó mediante la IP con el anticuerpo anti-HA de manera proporcional a la cantidad de anticuerpo utilizado. De modo confirmatorio, el análisis del SN que se descartó al final del experimento mostró una reducción de HA-βNrx1ΔC inversamente proporcional a

su purificación en el inmunoprecipitado. Estos datos muestran la elevada especificidad y eficiencia de la purificación del mutante de β Nrx1 en estos experimentos.

Es interesante mencionar la detección de tres bandas HA- β Nrx1 Δ C en el material purificado (figura 54 A). Mientras que la banda predominante y de mayor peso molecular (48kDa) corresponde a formas maduras de la proteína HA- β Nrx1 Δ C glicosilada (figura13), la movilidad electroforética de las dos bandas inferiores podría pertenecer a formas no maduras del mutante de β Nrx1, ya que equivalen al peso molecular teórico según su secuencia aminoacídica (36-37kDa).

Paralelamente, en este experimento testamos de manera preliminar la presencia de NL1 como posible ligando de HA- β Nrx1 Δ C. De modo interesante observamos que NL1 se co-purificó en los inmunocomplejos de forma lineal con HA- β Nrx1 Δ C. Este resultado tan claro apunta que el mutante de β Nrx1 no solamente se inserta en el terminal presináptico, sino que también es capaz de mediar contactos transinápticos *in vivo*. Además, este resultado prueba la validez de la aproximación experimental para analizar las posibles interacciones transinápticas mediadas por HA- β Nrx1 Δ C. Las condiciones experimentales utilizadas se encuentran dentro de un rango dinámico de purificación, permitiendo realizar cálculos para estimar los porcentajes de purificación con respecto a la proteína total.

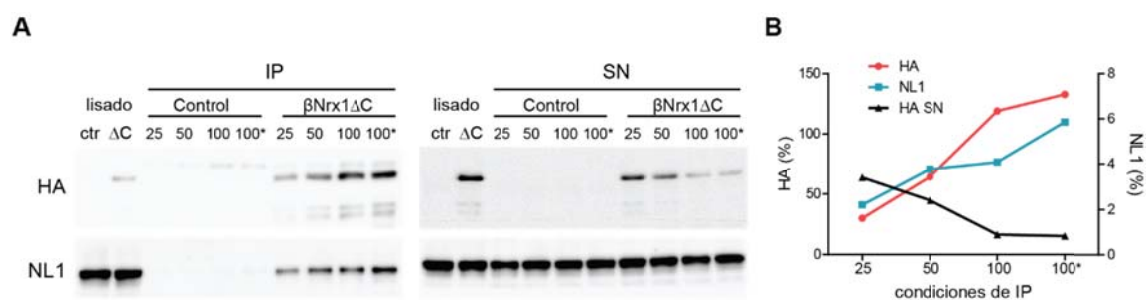


Figura 54. Experimento piloto para testar la eficiencia de la purificación del mutante HA- β Nrx1 Δ C mediante IP. Lisados de corteza de ratones control o β Nrx1 Δ C (Δ C) se incubaron con 25, 50 y 100ng de anticuerpo anti-HA, como se indica. Los inmunocomplejos se purificaron con 50 μ l de resina. La condición con 100ng de anticuerpo se ensayó en paralelo con 100 μ l resina (indicado con *). A.- Imágenes de *western blot* que analizan el lisado de partida y el material inmunoprecipitado (izquierda) o el SN descartado (derecha) con anticuerpos que reconocen HA y NL1. La exposición de la membrana del SN es superior a la de la membrana de las IPs para

poder detectar la proteína descartada. B.- Cuantificación de la intensidad de bandas del experimento. La cuantificación se realizó comparando la proteína inmunoprecipitada o descartada con respecto a la detectada en el lisado cargado en cada gel y teniendo en cuenta que el lisado cargado corresponde a un 16% del volumen de lisado sobre el que se realizó la IP. El eje de ordenadas izquierdo cuantifica la intensidad de HA y el derecho lo hace de NL1.

Para comprobar y analizar el grado de especificidad de la interacción del mutante HA- β Nrx1 Δ C con NL1 observada en el experimento anterior, decidimos testar la presencia de otros posibles ligandos postsinápticos de β Nrxn1 en nuevos experimentos de IP. En éstos utilizamos dos controles negativos. El primero se trata del propio *buffer* empleado en la IP incubado con anticuerpo anti-HA y la resina de sefarosa para detectar la señal inespecífica correspondiente al anticuerpo anti-HA. El segundo control negativo ya fue utilizado en el experimento piloto y consistió en realizar la IP partiendo de lisados de ratones control. Los complejos aislados se analizaron mediante *western blot* con anticuerpos específicos para la detección de las proteínas candidatas.

La figura 55 muestra tres réplicas independientes de este experimento, que destacan por una eficiente purificación de la proteína mutante (71.82% en promedio). La eficiencia se cuantificó como la intensidad de detección de HA- β Nrx1 Δ C en el inmunoprecipitado con respecto al lisado, teniendo en cuenta que el lisado cargado representa el 8% del volumen usado para la IP. De esta forma, si la intensidad de detección en el inmunoprecipitado fuera 12.5 veces superior a la del lisado, la eficiencia sería del 100% (8×12.5).

De manera específica, en estos experimentos observamos una selectividad por la unión de HA- β Nrx1 Δ C a NL1 y no a NL2, NL3 o LRRTM2. La eficiencia de purificación de estas proteínas se comparó respecto a la proteína presente en el lisado de manera similar a la utilizada para HA. Consistentemente se observó en estos experimentos que el 2.5% de la NL1 total se encuentra formando complejos transinápticos con HA- β Nrx1 Δ C en la corteza. Esta selectividad por la unión del mutante a NL1 y no a otras proteínas testadas indica que la disfunción de β Nrxns podría afectar exclusivamente a sinapsis que expresen NL1. Debido a que NL1 es altamente específica de sinapsis glutamatérgicas (Song et al., 1999), estos resultados indican que la disfunción de

β Nrxns a nivel cortical afecta preferentemente a las sinapsis excitatorias mediadas por NL1 en el modelo β Nrx1 Δ C.

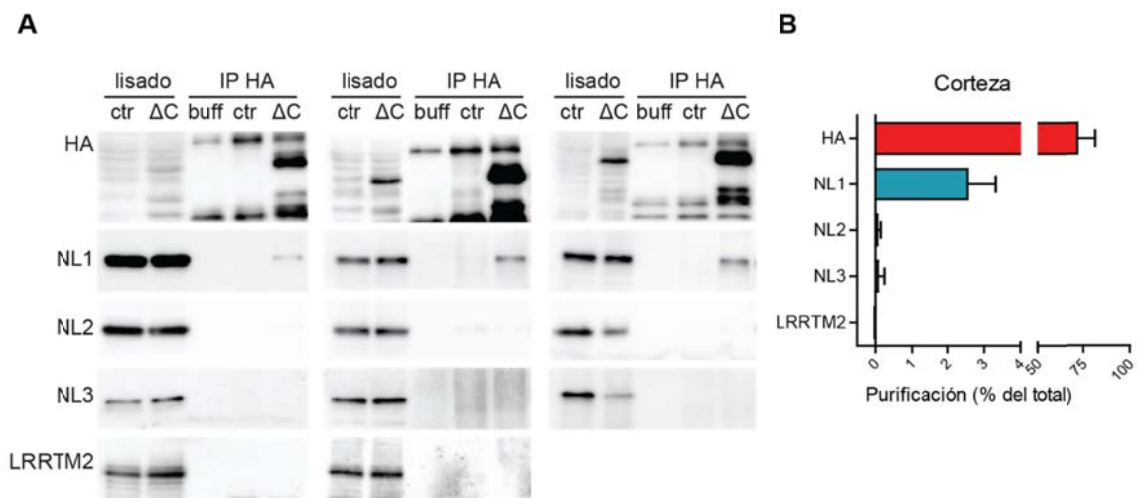


Figura 55. IP de complejos proteicos aislados con HA- β Nrx1 Δ C en corteza. A.- Los inmunocomplejos purificados con el anticuerpo HA se analizaron por *western blot* con los anticuerpos indicados. Se muestran tres experimentos independientes. Ctr- control; Δ C- β Nrx1 Δ C; buff- *buffer*. B.- Cuantificación de la purificación de cada proteína respecto a la presente en el lisado de partida de la IP (N= 2-4 experimentos). Todas las barras de error son SEM.

La expresión del mutante de β Nrxn1 podría afectar a ligandos sinápticos diferentes dependiendo de la región cerebral. Para analizar los contactos transinápticos afectados en regiones cerebrales distintas a la corteza realizamos experimentos de IP de HA- β Nrx1 Δ C en homogenados de estriado dorsal y posteriormente analizamos la presencia de las proteínas candidatas. Como se muestra en la figura 56, tras una eficiente purificación de HA- β Nrx1 Δ C (64.22%), observamos que la unión preferencial a NL1 se conservó en las inmunoprecipitaciones de estriado. De nuevo, no se observó la presencia de NL2, NL3 o LRRTM2 en dichos complejos. Por ello, las sinapsis estriatales afectadas por la disfunción de β Nrxns en el modelo β Nrx1 Δ C son los contactos glutamatergicos mediados por NL1. Debido a que las estructuras diana de las MSN del estriado no se contienen en los lisados de este experimento, podemos concluir que la unión HA- β Nrx1 Δ C/NL1 observada proviene de las proyecciones cortico-estriatales.

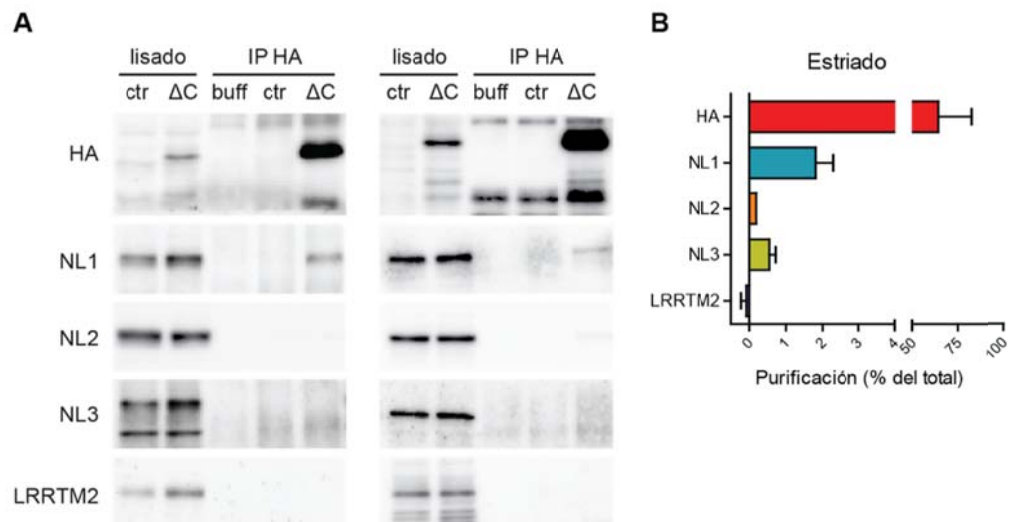


Figura 56. IP de HA en lisados de estriado. A.- Análisis del material inmunoprecipitado por *western blot* con los anticuerpos indicados. Se muestra el resultado de dos experimentos independientes. Ctr- control; ΔC- βNrx1ΔC; buff- *buffer*. B.- Cuantificación de la purificación de cada proteína respecto a la presente en el lisado de partida de la IP. N=2 experimentos. Todas las barras de error son SEM.

4.1.2 Confirmación de los ligandos sinápticos asociados a HA-βNrx1ΔC mediante IP de NL

Con el objetivo de confirmar la unión específica de NL1 y no de otros ligandos candidatos al mutante HA-βNrx1ΔC *in vivo*, realizamos inmunoprecipitaciones reversas. Para purificar los inmunocomplejos utilizamos los anticuerpos que reconocen NL1, NL2 y NL3 y analizamos por *western blot* la presencia del mutante HA-βNrx1ΔC (figura 57).

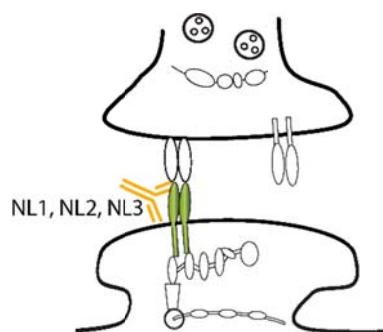


Figura 57. Representación esquemática de las IP reversas con los anticuerpos anti-NL1, NL2 o NL3. Se muestra la localización postsináptica de las NL, marcadas en verde.

En estos experimentos obtuvimos una eficiencia de purificación de las NL de 34-50% del total presente en el lisado (figura 58). Al analizar con el anticuerpo anti-HA el material inmunoprecipitado observamos la confirmación de la unión de HA- β Nrx1 Δ C a NL1 (1.15% con respecto al HA- β Nrx1 Δ C total). Una demostración adicional de que esta interacción ocurre en membrana es que sólo se detectó la banda de 48kDa, correspondiente a las formas maduras glicosiladas de HA- β Nrx1 Δ C y no las bandas de menor peso molecular. En el caso de la IP de NL2 se observó en el *western blot* una leve banda de peso molecular correspondiente a la proteína transgénica madura (0.60% del HA- β Nrx1 Δ C total). Sin embargo, la formación de complejos HA- β Nrx1 Δ C/NL2 no es clara ya que en la IP directa del mutante de β Nrxn1 no se observó presencia específica de NL2 (figura 55). En los inmunoprecipitados de NL3 no se detectó la presencia de HA- β Nrx1 Δ C, replicando la falta de interacción de HA- β Nrx1 Δ C con NL3 que habíamos observado en la aproximación anterior. La detección de otras isoformas de NL en los inmunoprecipitados sugirió la presencia de heterodímeros de NL, como NL1/NL3. Sin embargo, la ausencia de HA- β Nrx1 Δ C en los inmunoprecipitados de NL3 sugiere que la proteína HA- β Nrx1 Δ C se une preferencialmente a homodímeros de NL1 pero no a heterodímeros NL1/NL3.

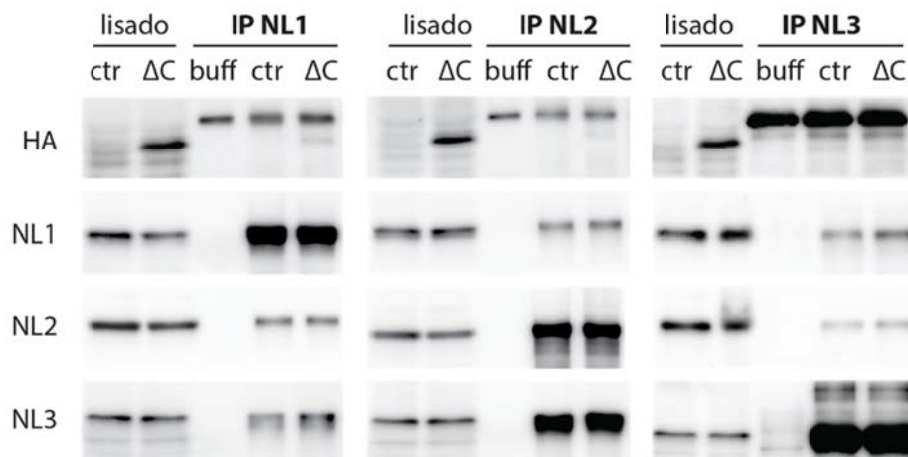


Figura 58. IP de NL1, NL2 y NL3 en lisados de corteza. Los inmunoprecipitados se testaron con los anticuerpos indicados por *western blot*. Ctr- control; Δ C- β Nrx1 Δ C; buff- *buffer*.

4.1.3. Análisis de las interacciones tempranas mediadas por el mutante HA- β Nrx1 Δ C

Para analizar si la especificidad de las interacciones mediadas por el mutante de β Nrxn1 dependían de un proceso de selección temporal, realizamos inmunoprecipitaciones con el anticuerpo anti-HA en lisados corticales tras la re-expresión de corta duración del mutante de β Nrxn1. Como hemos demostrado anteriormente, el sistema inducible Tet-off empleado en la generación del modelo de ratón β Nrx1 Δ C nos permite el apagado de la expresión del mutante de β Nrxn1 mediante el tratamiento con Dox (figura 25). Además, hemos demostrado que el mutante HA- β Nrx1 Δ C se re-expresa al retirar dicho fármaco de la dieta a partir de los 14 días (figura 27). En este experimento, a ratones dobles transgénicos que habían recibido dieta con Dox se les permitió la re-expresión del transgén durante 34 días (Dox on/off). En lisados corticales de estos animales se realizaron experimentos de co-IP con el anticuerpo HA. Como se observa en la figura 59, el mutante re-expresado se inmunoprecipitó en los ratones Dox on/off con una alta avidéz, equivalente a la observada a un ratón β Nrx1 Δ C adulto con expresión continua del transgén (Dox off). Así mismo, NL1 se co-inmunoprecipitó con una afinidad similar en los ratones doble transgénicos con expresión de HA- β Nrx1 Δ C de corta duración comparada con la observada previamente en ratones con expresión mantenida de HA- β Nrx1 Δ C. De forma interesante, no se observó unión de HA- β Nrx1 Δ C con NL2, NL3 o LRRTM2 en los inmunoprecipitados, confirmando la especificidad de la interacción con NL1. En el caso de NL2 se observó una leve banda inespecífica que está presente incluso en los inmunoprecipitados de ratones control. Estos datos indican que la interacción del mutante de β Nrxn1 con NL1 no se debe a una selección sobre otro tipo de interacciones que pudieran eliminarse con el tiempo.

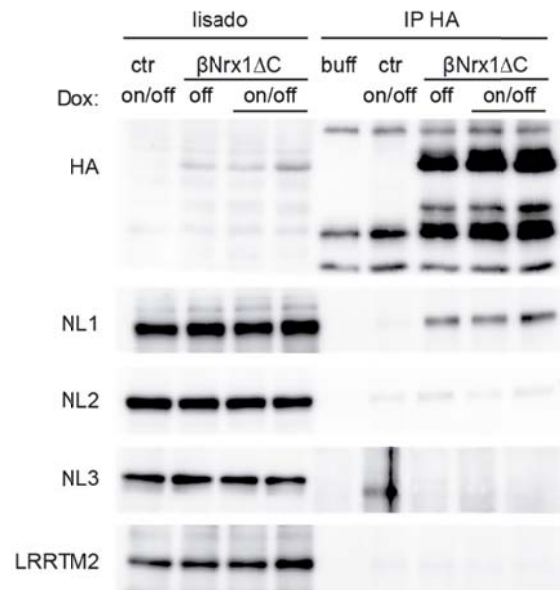


Figura 59. IP de HA-βNrx1ΔC en corteza de ratones con expresión de corta duración. Se comparan inmunoprecipitados obtenidos a partir de corteza de animales βNrx1ΔC con expresión mantenida del transgén (Dox off) y βNrx1ΔC mantenidos con Dox durante 14 días a los que posteriormente se les alimentó con dieta normal durante 34 días (Dox on/off). El *western blot* se analiza con los anticuerpos indicados a la izquierda. Ctr- control; buff- *buffer*.

En conjunto, los resultados obtenidos mediante los experimentos de IP directa y reversa muestran una interacción robusta entre el mutante HA-βNrx1ΔC y NL1 que apunta a un efecto específico del mutante de βNrxn1 en las sinapsis glutamatérgicas mediadas por NL1.

4.2. Análisis de los circuitos cerebrales relacionados con la interacción social y afectados por el comportamiento asociado al TEA

La caracterización del ratón β Nrx1 Δ C indica que la expresión del mutante de β Nrxn1 en el terminal presináptico de las neuronas principales de corteza y estriado afecta a la función sináptica glutamatérgica de determinados circuitos neuronales, de manera que la disfunción de dichos circuitos causaría los defectos de comportamiento asociados al autismo. Por otra parte, la recuperación del comportamiento normal en el ratón β Nrx1 Δ C tras el apagado del transgén sugiere que la caracterización de dichos circuitos podría identificar dianas terapéuticas para el tratamiento del TEA.

Para evaluar la implicación de distintos circuitos cerebrales durante el comportamiento social, cuya afectación se encuentran entre los criterios diagnósticos del TEA, decidimos estudiar la actividad neuronal en diferentes estructuras cerebrales durante la ejecución de tareas de interacción social. Como es evidente, estos estudios implican realizar registros electrofisiológicos en ratones despiertos mientras realizan la tarea. Para ello, establecimos una colaboración con el grupo de los Drs. Agnès Gruart y José María Delgado, de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, expertos en el registro electrofisiológico de animales durante la realización de ensayos de comportamiento. Esta colaboración se estableció dentro del marco del proyecto “*Red para el estudio de las sinapsis en el contexto de la disfunción cognitiva*” (SynCogDys).

4.2.1. Estructuras cerebrales seleccionadas para el registro electrofisiológico *in vivo*

El principal objetivo del estudio consistió en el análisis de la actividad de los circuitos cerebrales durante la interacción social en ratones control, para poder identificar patrones de actividad diferenciales implicados en el desarrollo de tareas sociales. Además, para afianzar la especificidad de dicha actividad durante la sociabilización, decidimos utilizar el modelo β Nrx1 Δ C como control negativo de la preferencia social. De esta forma, esperábamos detectar patrones de actividad de los circuitos específicamente provocados por la interacción social, identificados como aquellos

cambios originados por la interacción social en el ratón control que, a su vez, se vieran reprimidos en el ratón β Nrx1 Δ C.

El método utilizado para evaluar la actividad electrofisiológica *in vivo* fue el registro del potencial de campo local (LFP del inglés *Local Field Potential*). El LFP refleja la suma de cambios en el potencial de las neuronas que se encuentran en la vecindad de un electrodo, por lo que muestra el comportamiento medio de los ritmos de actividad de los circuitos neuronales próximos al mismo (Buzsáki, 2006).

La elección de las regiones cerebrales estudiadas estuvo motivada por dos razones: su potencial relación con el comportamiento social y su posible afectación por la disfunción de β Nrxns en el ratón β Nrx1 Δ C (Figuras 20, 21).

En pacientes con TEA se ha descrito una deficiencia en la conectividad de la corteza prefrontal (Gotts et al., 2012), región estrechamente asociada con la motivación social, el reconocimiento social y la dominancia jerárquica (Bicks et al., 2015). En el modelo β Nrx1 Δ C existe una escasa o casi nula expresión del mutante de β Nrxn1 en la región prelímbica (PrL) de la corteza prefrontal, aunque estas neuronas reciben proyecciones procedentes de otras regiones con elevada expresión del mutante, como son la corteza cingulada o motora (figura 21) (DeNardo et al., 2015).

Por otra parte, el estriado se ha propuesto como nodo de los déficits asociados con el autismo (Fuccillo, 2016). En pacientes con TEA se ha descrito un incremento anormal en la conectividad funcional entre subregiones del estriado con las conexiones que realiza con otras regiones cerebrales (Di Martino et al., 2011) y se ha observado un mayor impacto de las mutaciones asociadas con TEA en las MSNs y en las neuronas corticales que las inervan (Chang et al., 2015). El ratón β Nrx1 Δ C presenta la mayor expresión de la proteína mutante en el estriado dorsal o Caudado-Putamen (CPu) (figuras del apartado 1), que a su vez recibe innervaciones provenientes de regiones corticales positivas para la expresión del transgén como las cortezas cingulada, motora y somatosensorial (Guo et al., 2015).

Por ello, las estructuras elegidas para la implantación de los electrodos de registro fueron PrL y Cpu. Además, se seleccionó la corteza somatosensorial primaria (S1BF) como otra zona cortical de expresión elevada del transgén (figura 21).

Los electrodos para el registro de LFP se construyeron e implantaron en las regiones seleccionadas por José Antonio Santos Naharro y José María González Martín respectivamente, del grupo de los Drs. Agnès Gruart y José María Delgado. El extremo de los electrodos cuenta con dos puntas de registro independientes ligeramente separadas, disminuyéndose de esta manera la probabilidad de registro fallido en una región. Mediante cirugía estereotáxica se colocaron los electrodos en las regiones seleccionadas del hemisferio derecho. (Coordenadas en Materiales y Métodos, tabla 7). En el cráneo se implantó un tornillo de acero inoxidable como toma de tierra. El extremo apical de los electrodos se soldó a un conector y se cubrió y fijó al cráneo con cemento dental (figura 60). A este conector se conectaron inmediatamente antes de iniciar un registro los cables que transmiten la información al ordenador.



Figura 60. Aspecto de un ratón tras la cirugía de implantación de los electrodos. Nótese las dos ranuras situadas en el conector donde se conectarán los cables de registro.

4.2.2. Estudio del comportamiento social durante el registro electrofisiológico *in vivo*

El paradigma escogido para analizar el comportamiento social fue el test de sociabilidad *3-chamber*, que como hemos descrito anteriormente evalúa la interacción del ratón con estímulos enrejados situados en dos habitaciones adyacentes a la habitación central. Este test fue seleccionado porque representa una prueba muy

robusta y específica para evaluar la interacción social motivada por el ratón analizado, que además habíamos caracterizado en profundidad en el ratón β Nrx1 Δ C. Sin embargo, las características del aparato de *3-chamber* hacía muy complicado el registro *in vivo* simultáneo al comportamiento. Las grandes dimensiones de la caja (60x42cm) obligaban el uso de cables de suficiente longitud que transmitieran la información registrada por los electrodos. El ratón debe ser capaz de soportar estos cables unidos al conector situado en su cabeza, lo cual le representa un peso elevado en proporción a su propio cuerpo, todo un reto que se suma al posible estrés que le representa la nueva situación. Además, las tres habitaciones en las que se divide el aparato están conectadas por unas puertas cuyo marco superior frena el paso de los cables.

Por estos motivos, realizamos una serie de adaptaciones acordes con las nuevas necesidades experimentales (Figura 61). Algunos ejemplos de las adaptaciones que llevamos a cabo fueron: i) inclusión de una fase adicional de habituación durante dos días previos al experimento; ii) acortamiento de la duración de la fase de habituación del día del experimento, que pasó de 10 a 5 minutos; iii) desplazamiento de los cilindros enrejados que contienen los estímulos desde las esquinas al centro de las habitaciones laterales para minimizar el desplazamiento del ratón analizado; iv) construcción de un sistema con un raíl y una polea para disminuir la longitud y el peso de los cables soportado por el animal; v) sustitución de las paredes que subdividen las habitaciones por unos tabiques parciales que permitieran el paso del cableado (ver materiales y métodos para mayor detalle de las modificaciones realizadas).

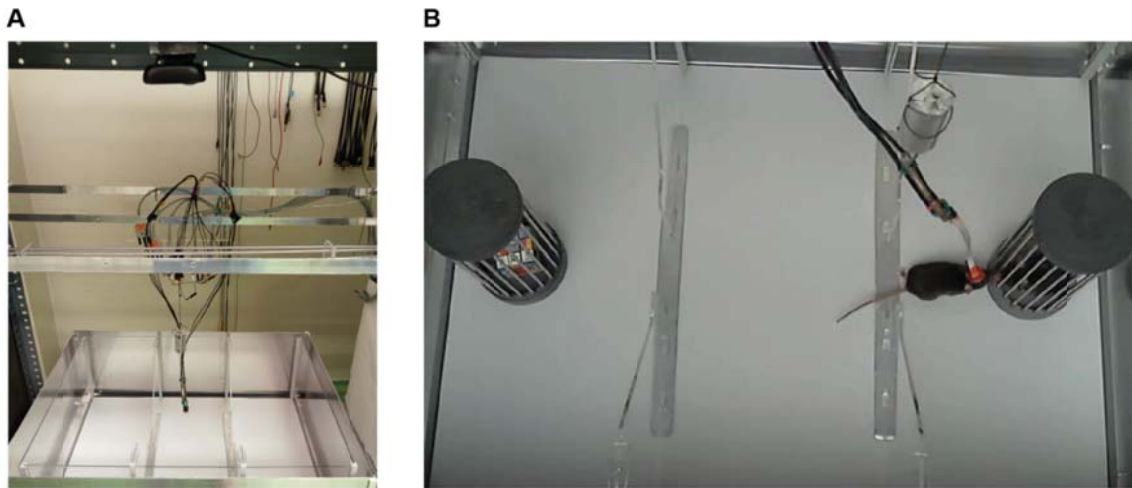


Figura 61. Aparato de *3-chamber* modificado para simultanear la prueba de sociabilidad con el registro electrofisiológico *in vivo*. A.- Vista general del aparato *3-chamber* con el sistema de raíl con polea y los cables de registro. B.- Vista superior del aparato *3-chamber* modificado, mostrando un ratón durante la fase de sociabilidad. Nótese la disposición del cable sujeto por el sistema diseñado, que permite el movimiento del ratón. También se pueden apreciar los tabiques parciales que separan los compartimentos.

En la ejecución y análisis del test de *3-chamber* intervinimos dos investigadoras. Florbela da Rocha Almeida (encargada de controlar la correcta colocación de los cables y los electrodos y de la obtención y análisis de los registros electrofisiológicos) y la autora de esta Tesis Doctoral (encargada del manejo de los animales y de la parte comportamental del experimento, así como del análisis del comportamiento social).

Realizamos el experimento de registro de LFP *in vivo* en 16 ratones control (10 *wild-type* y 6 transgénicos simples TRE-HA- β Nrx1 Δ C) y 14 dobles transgénicos β Nrx1 Δ C. A pesar de las modificaciones realizadas para adaptar el protocolo estándar de la prueba *3-chamber*, encontramos que algunos ratones presentaban dificultades en su ejecución, puesto que no visitaron los tres compartimentos del aparato. Esto podría suponer un sesgo que afectase a la interacción. Por este motivo, eliminamos del análisis los ratones que no visitaron al menos una vez las dos habitaciones laterales durante la habituación del día del test o durante la fase experimental en cuestión.

A continuación se evaluó el comportamiento social de los animales en el test de *3-chamber* modificado. En la fase de preferencia social los ratones control presentaron

un mayor tiempo de interacción con el control que con el objeto (Figura 62 A). Por el contrario, los ratones β Nrx1 Δ C mostraron un descenso de la interacción con el ratón y un incremento con el objeto (Figura 62 A).

Durante la fase de preferencia por la novedad social los ratones control mostraron una mayor interacción con el ratón nuevo que con el familiar, mientras que los ratones β Nrx1 Δ C interaccionaron un menor tiempo con el ratón nuevo y no presentaron preferencia por la novedad social (Figura 62 B).

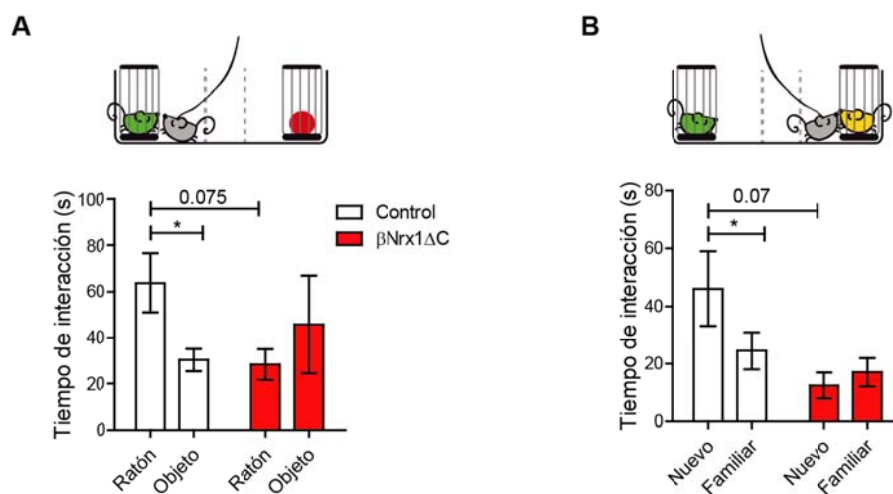


Figura 62. Interacción social en el test 3-chamber durante el registro electrofisiológico *in vivo*. En la parte superior se muestra un diagrama explicativo del test. A.- Test de preferencia social en ratones control (N=14) y doble transgénicos β Nrx1 Δ C (N=7). B.- Test de preferencia de la novedad social en ratones control (N=13) y doble transgénicos β Nrx1 Δ C (N=8). Edad: 4-7 meses. Sexo: machos. Análisis estadístico: *two-way* ANOVA con medidas repetidas y *post hoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples.

La similitud de los valores de interacción obtenidos en este experimento con respecto a los experimentos anteriormente realizados sin registro electrofisiológico (figuras 34—36, 38) probaron que las modificaciones realizadas no alteraron la interacción de los ratones con los estímulos presentados. Además, este experimento reproduce los defectos en comportamiento social obtenidos en experimentos previos del modelo β Nrx1 Δ C (figuras 34—36, 38), ya que replica la reducción en la preferencia social y en la preferencia por la novedad social con respecto a los ratones control. Estos hechos

validan el nuevo protocolo para el estudio mediante electrofisiología *in vivo* del comportamiento social y su afectación con la disfunción de β Nrxns.

4.2.3. Comprobación de las coordenadas de registro electrofisiológico y expresión comparativa del mutante HA- β Nrx1 Δ C

Las coordenadas de registro de los electrodos fueron corroboradas al final del experimento mediante tinción de Nissl. Como podemos ver en la figura 63 B, la cicatriz que se genera al implantar el electrodo permite visualizar *a posteriori* el punto de registro, que corresponde con PrL, Cpu y S1BF. Como podemos ver en la inmunohistoquímica realizada en cortes coronales, el mutante HA- β Nrx1 Δ C se expresa en las regiones coincidentes con las coordenadas de registro de CPU y S1BF y de manera más tenue en unas escasas neuronas en la parte más dorsal de PrL (figura 63 C, D).

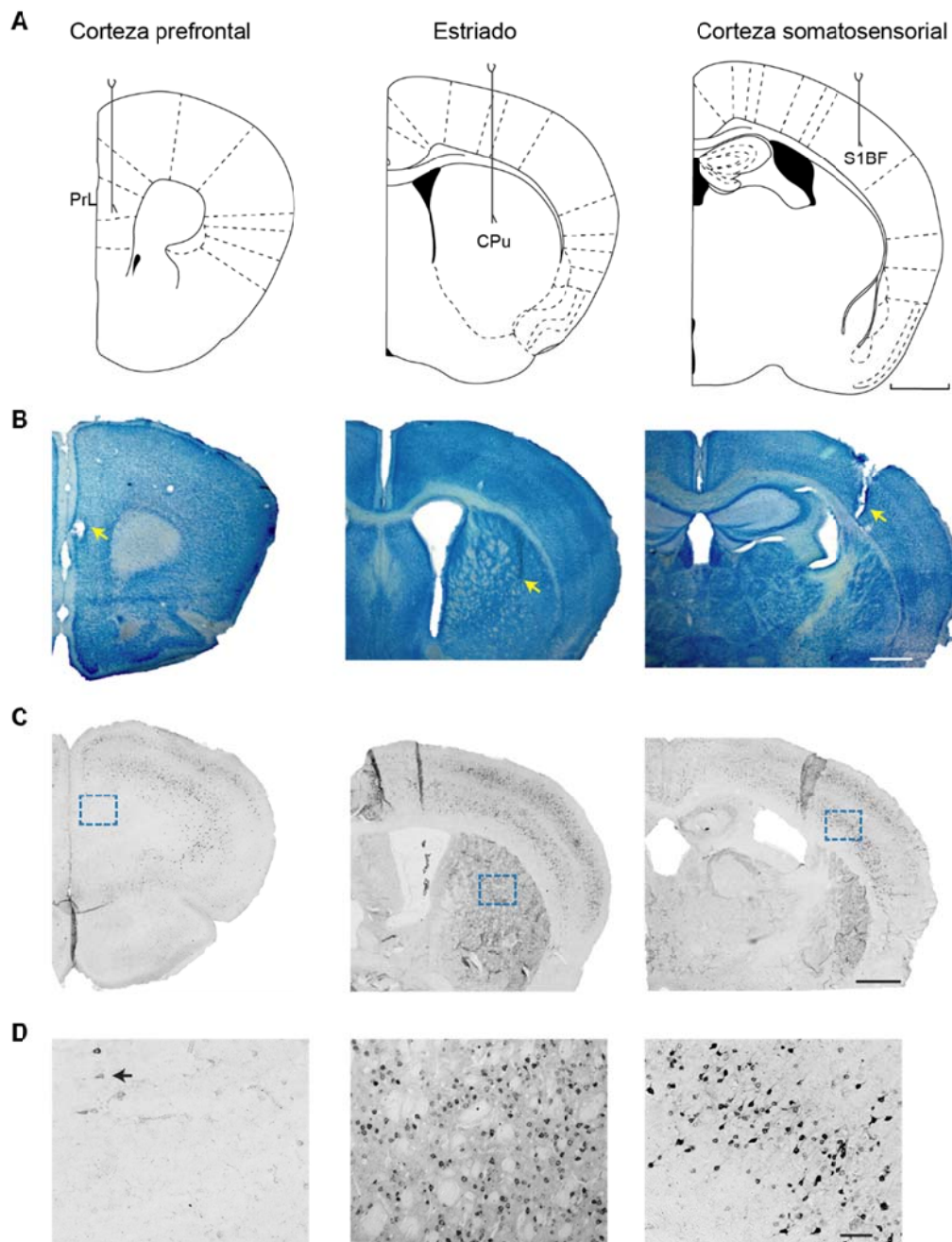


Figura 63. Sitios de registro de LFP en la Corteza prefrontal (PrL), Estriado dorsal (CPu) y Corteza somatosensorial (S1BF). A.- Representación de las coordenadas de registro en el atlas estereotáxico de ratón. B.- Análisis de la localización de los electrodos implantados mediante tinción de Nissl. Se puede observar la cicatriz generada por el electrodo, señalada con una flecha amarilla. C.- Análisis por inmunohistoquímica de la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C con el anticuerpo anti-HA en planos coronales coincidentes con la coordenada antero-posterior de registro. D.- Magnificación de la tinción por inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-HA en los sitios de registro. La flecha negra en PrL muestra una célula positiva para HA. Las escalas de tamaño representan 1mm (A) 750 μ m (B, C) y 75 μ m (D).

4.2.4. Resultados del registro electrofisiológico *in vivo*

La grabación del experimento de comportamiento nos permitió estudiar el registro electrofisiológico en los momentos concretos de interacción del ratón con los estímulos. En el momento de escritura de esta Tesis Doctoral, el análisis de los registros electrofisiológicos generados se había realizado sobre la fase de preferencia social (objeto vs ratón). Los registros seleccionados para el análisis provienen de animales que interaccionaron con los dos estímulos y que presentaron una correcta colocación de los electrodos. Seleccionamos eventos de interacción estrecha con el ratón y el objeto de un segundo de duración y analizamos las ondas registradas durante esos intervalos (ejemplo de registro en figura 64).

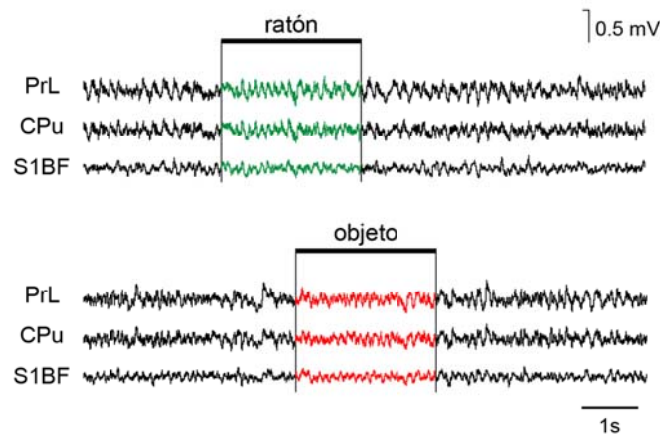


Figura 64. Ejemplo del patrón de ondas generadas en un ratón control. Se muestran las ondas en las tres estructuras registradas (S1BF, mPFC y CPu) a lo largo de 10 segundos. El intervalo en diferente color señala la duración de la interacción con el objeto o el ratón.

En total, analizamos 25 intervalos de registro de ratones control y 20 de ratones β Nrx1 Δ C para cada tipo de interacción (ratón y objeto) y región cerebral (PrL, CPu y S1BF). Utilizando estos registros calculamos el poder espectral promedio de cada condición a lo largo del tiempo y lo representamos en gráficos de espectrogramas (figura 65). En estos gráficos, el eje de ordenadas muestra la frecuencia de las ondas (Hz), el eje de abscisas mide el tiempo (un segundo) y la escala colorimétrica representa el logaritmo del cálculo de la amplitud de las ondas y de la cantidad de sus armónicos, de modo que podemos conocer la actividad de las diferentes frecuencias

de onda durante cada instante del segundo de interacción. La frecuencia de 50Hz se filtró durante el registro para eliminar las interferencias que se generaban por los aparatos electrónicos a esa frecuencia. Por este motivo, las frecuencias cercanas a 50Hz mostraron un menor poder espectral en los espectrogramas (figura 65).

La frecuencia de las ondas se clasifica en intervalos o bandas de frecuencia: delta (1.5-4Hz), theta (4-10 Hz), beta (10-30Hz) y gamma (30-100Hz) (Buzsáki, 2006). Para obtener una lectura cuantitativa de la actividad de las bandas de frecuencia, calculamos el valor promedio del poder espectral de todos los puntos de cada banda de frecuencia durante un segundo. Estos resultados permiten comparar las diferentes condiciones mediante histogramas (figura 66) y realizar un análisis estadístico de las diferencias.

Los resultados obtenidos permitieron descubrir un patrón de actividad cerebral exclusivamente social y específico de la región cerebral en los ratones control, que consistió en un incremento del poder espectral de la banda de frecuencia delta en PrL y CPu durante la interacción con el estímulo social, frente al registrado con la interacción no social (figuras x y x). Este patrón presenta especificidad de circuito, puesto que no es compartido por S1BF, que mostró una actividad delta muy similar entre la interacción social y la no social. Además se observaron otros cambios de menor magnitud durante la interacción con el ratón, como un ligero aumento en las ondas theta y un descenso en las ondas beta en CPu.

Además, el control negativo de preferencia social aportado por los ratones β Nrx1 Δ C, nos permitió confirmar la especificidad de la aparición de dicho patrón durante la interacción social. De forma interesante, el modelo de autismo β Nrx1 Δ C mostró una actividad similar en la actividad delta en PrL y CPu en la interacción con el estímulo social y no social, presentando valores cercanos al valor de actividad que presentaron los ratones control durante la interacción con el objeto (figuras x y x). Por tanto, el incremento en las ondas delta en PrL y CPu ocasionado por la interacción con el estímulo social en los ratones control se impide en los ratones β Nrx1 Δ C.

Además, los ratones β Nrx1 Δ C presentaron otras alteraciones. De manera llamativa y en comparación con los ratones control, los ratones β Nrx1 Δ C mostraron una reducción

generalizada de la actividad de todas las bandas de frecuencia en S1BF, que redujeron a menos de la mitad el poder espectral observado en los ratones control, así como una reducción en la amplitud de beta y gamma en las tres regiones analizadas (figuras x y x).

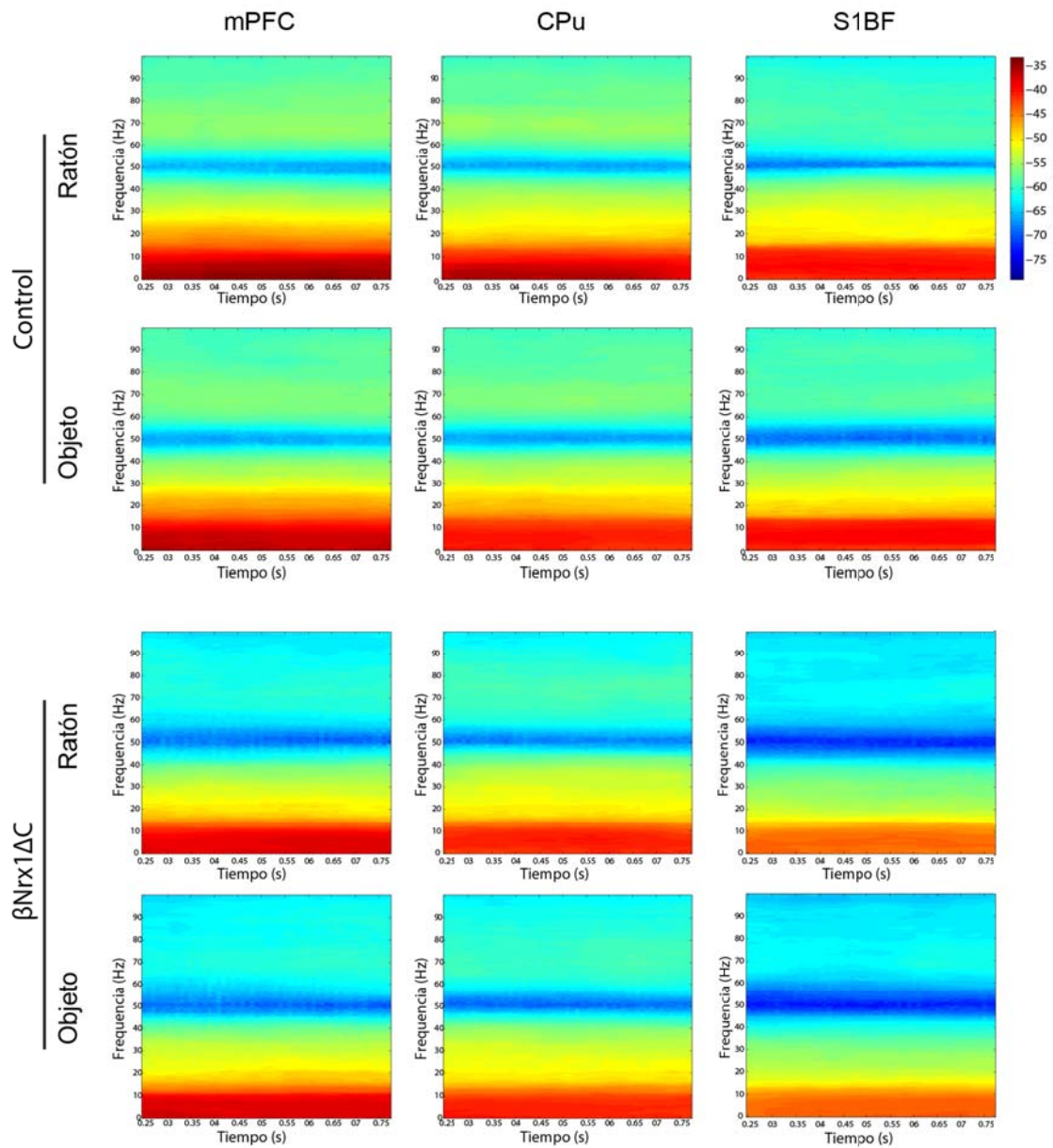


Figura 65. Representación en espectrogramas del poder espectral del registro de LFP *in vivo*.

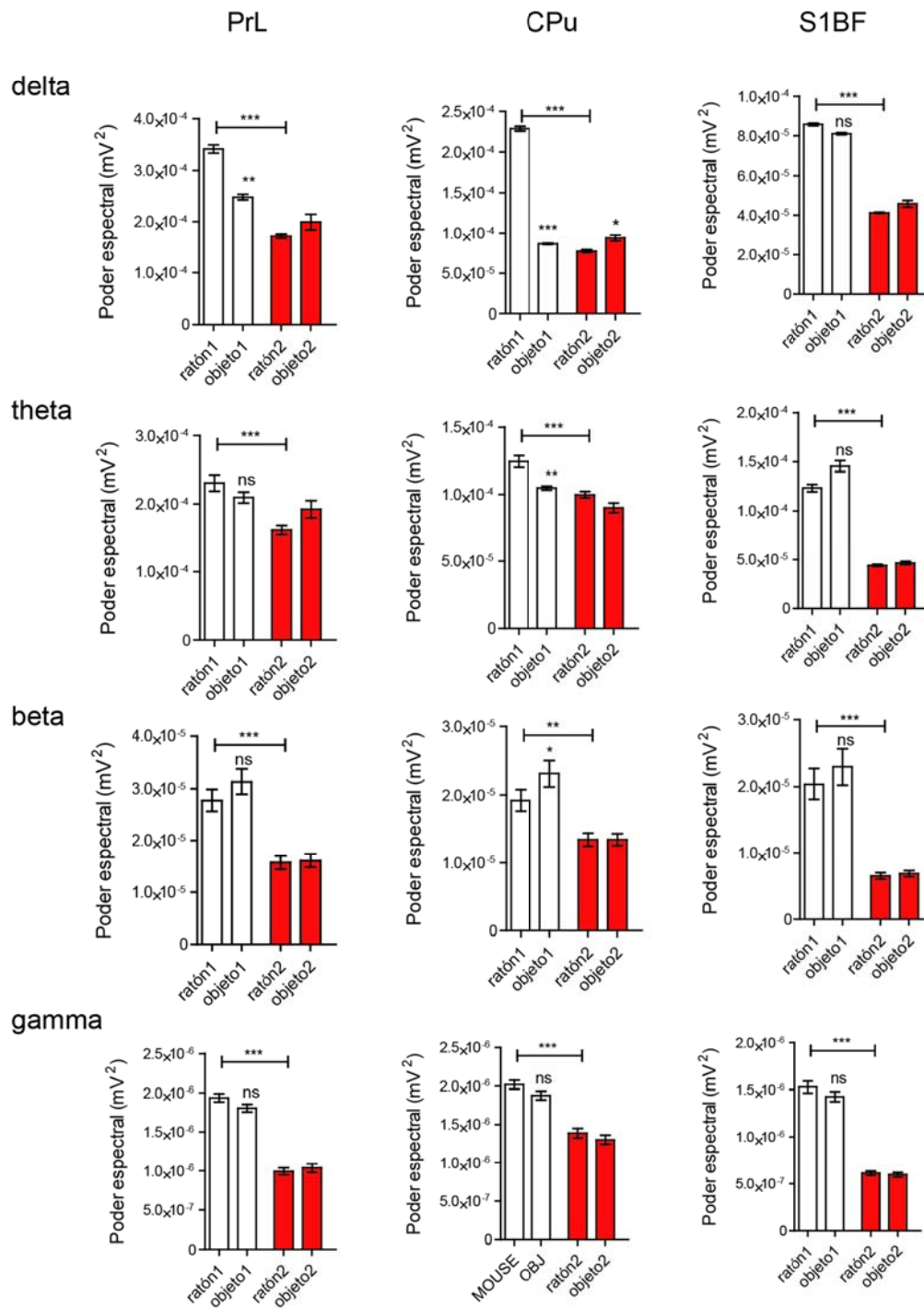


Figura 66. Cuantificación del poder espectral promedio para las bandas de frecuencia indicadas del registro de LFP *in vivo*. Análisis estadístico: Kruskal-Wallis, *post hoc* de Dunn; **p-value* < 0.05; ***p-value* < 0.01; ****p-value* < 0.001. Todas las barras de error son SEM.

Los datos obtenidos en el experimento de *3-chamber* acoplado al registro de LFP *in vivo* nos permiten concluir que existen patrones de actividad neuronal asociados a determinados circuitos propios de la interacción social. De manera confirmatoria, este patrón electrofisiológico se ve impedido en condiciones de falta de preferencia social en el ratón $\beta\text{Nrx1}\Delta\text{C}$. La identificación en detalle de los mecanismos asociados a la contribución diferencial de los circuitos durante el establecimiento de estos patrones de actividad podría contribuir al entendimiento del llamado “cerebro social” y servir de base para el desarrollo de terapias aplicables al autismo.

4.3. Disección de los circuitos cerebrales implicados en el comportamiento asociado al TEA

Mediante el registro LFP *in vivo* hemos demostrado que la interacción social provoca patrones de actividad diferencial en determinados circuitos cerebrales mediados por PrL y CPu. Además, la disfunción de βNrxn asociada a defectos en interacción social impide que se generen dichos patrones. Estos defectos en PrL y CPu podrían explicarse por varias causas no necesariamente excluyentes: por una posible disfunción de βNrxn en las conexiones locales de esas regiones, por defectos sinápticos de los terminales que proyectan hacia esas regiones desde otras estructuras, o por mecanismos compensatorios que intentaran contrarrestar la disfunción de βNrxn . Para tratar de discriminar entre estas posibilidades decidimos expresar localmente el mutante de βNrxn mediante inyección estereotáxica y posteriormente analizar su efecto en pruebas de comportamiento con relevancia en el autismo. Esta aproximación nos permite analizar el efecto de la disfunción de βNrxn en una región cerebral concreta sobre el comportamiento del ratón.

El sistema de expresión génica escogido fue la transducción lentiviral con vectores específicos de neuronas (Gascón et al., 2008). De esta forma se permite la expresión estable y duradera del transgén en neuronas, evitando la expresión en células vecinas no neuronales. Generamos partículas lentivirales que contenían la construcción HA- $\beta\text{Nrx1}\Delta\text{C}$ bajo el control del promotor de sinapsina para dirigir la expresión a neuronas.

Como control negativo del experimento generamos partículas lentivirales que codificaban GFP o HA- β Nrxn1, ambas también bajo el promotor de sinapsina. Todas las producciones lentivirales se testaron previamente en cultivos neuronales para verificar su capacidad de inducir la síntesis proteica de GFP, HA- β Nrx1 y HA- β Nrx1 Δ C (Figura 67).

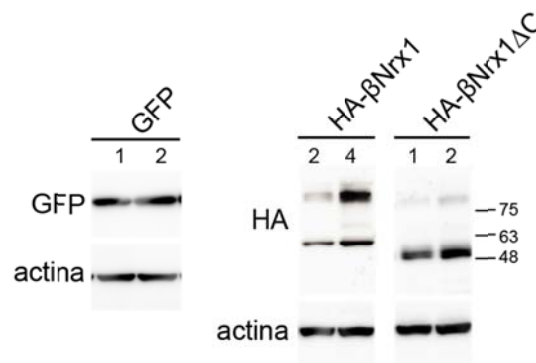


Figura 67. Análisis *in vitro* de la expresión de los vectores lentivirales syn-GFP, syn-HA- β Nrx1 y syn-HA- β Nrx1 Δ C mediante infección de cultivos de neuronas de hipocampo y *western blot*. En la parte superior de cada carril se indica el volumen de preparación viral utilizado (1, 2 o 4 μ l).

4.3.1 Inyección estereotáxica de HA- β Nrx1 Δ C para generar la disfunción local de β Nrx

Los experimentos previos habían demostrado un aumento en las ondas delta en CPU provocado por la interacción social, que además se impide en el modelo de autismo β Nrx1 Δ C (figuras 65, 66). Además, el CPU es una de las regiones cerebrales que muestra mayor expresión de la proteína transgénica en el ratón β Nrx1 Δ C (figura 20). Por estas razones, decidimos analizar la influencia que tiene la disfunción de β Nrxn en las células del estriado dorsal sobre el comportamiento relacionado con el autismo.

En ratones *wild-type* C57BL/6J de tres meses profundamente anestesiados inyectamos partículas lentivirales en CPU mediante cirugía estereotáxica. Se inyectaron 10 ratones con lentivirus syn-GFP, 8 ratones con syn-HA- β Nrx1 y 10 con el mutante syn-HA- β Nrx1 Δ C. En experimentos preliminares no mostrados, una inyección de 1 μ l de lentivirus syn-GFP provocó la expresión de la proteína exógena dentro de un diámetro de aproximadamente 1mm, evaluado mediante la señal de GFP somática. Para intentar

maximizar el área de expresión realizamos inyecciones bilaterales, cada una con dos puntos de inyección en las mismas coordenadas x e y pero separados por 0.5mm en el eje dorso-ventral (AP +0.5mm; ML +/-2mm; DV -3 y -3.5mm). Esta aproximación ha sido utilizada anteriormente en experimentos similares (Welch et al., 2007). Inyectamos 1 μ l de preparación lentiviral en cada punto, 4 μ l totales por animal. Para minimizar el daño provocado en el parénquima cerebral la inyección se realizó con una aguja de muy bajo calibre (35G) y a una velocidad constante de 200nl/minuto. Antes de retirar la aguja tras cada inyección esperamos 5 minutos para favorecer la difusión y evitar así arrastrar hacia la corteza partículas virales recombinantes.

Tras permitir la expresión de las construcciones virales durante tres semanas, realizamos los test de comportamiento y sacrificamos los ratones para analizar la localización y los niveles de expresión de las proteínas inducidas. El patrón de expresión se evaluó con la tinción de cortes coronales mediante inmunohistoquímica, que mostraron la expresión de GFP en CPu y no en otras estructuras adyacentes (Figura 68). Además, aunque pudimos detectar los dos puntos de inyección del eje dorso-ventral como regiones más intensas de GFP, la expresión somática de la proteína se extendió hasta ocupar la mayoría de la superficie del CPu (figura 68). Confirmamos también la expresión de las proteínas GFP, HA- β Nrx1 y HA- β Nrx1 Δ C mediante *western blot* en lisados de estriado. Para descartar un escape de la expresión viral a la corteza, situada en el tracto de la aguja, se diseccionó en paralelo la región cortical adyacente a la perforación. Como se puede observar en la figura 68 D, las bandas correspondientes a GFP, HA- β Nrx1 y HA- β Nrx1 Δ C se detectaron en las muestras de estriado, mientras que estaban ausentes en los lisados corticales.

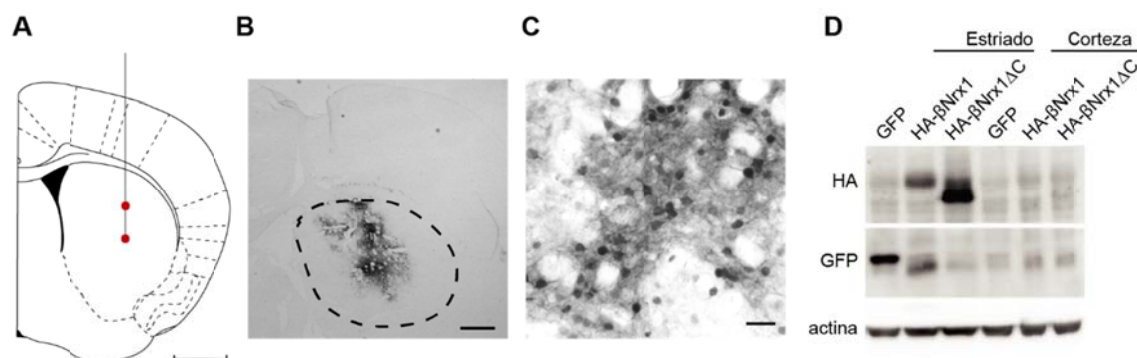


Figura 68. Expresión de vectores lentivirales en el estriado mediante inyección estereotáxica *in vivo*. A.- Diagrama de la localización de las inyecciones. Los dos puntos de inyección están separados por 0.5mm en el eje dorso-ventral. B.- Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-GFP en cortes coronales. La línea discontinua marca los márgenes del CPu. Se pueden observar los dos puntos de inyección, que presentan más señal GFP. C.- Magnificación de la expresión de GFP en el estriado dorsal. D.- Análisis por *western blot* de lisados de estriado y corteza de animales infectados. El área cortical diseccionada se restringió a la más cercana al punto de inyección. Escalas de tamaño: 1mm (A) 500 μ m (B) 100 μ m (C).

4.3.2 Análisis del comportamiento asociado al autismo en ratones con disfunción local de β Nrxn1

La evaluación de los reflejos sensori-motores no mostró cambios derivados del procedimiento, por lo que pasamos a realizar pruebas comportamentales destinadas a evaluar el comportamiento asociado al autismo. Decidimos realizar el test de *self-grooming* para evaluar el comportamiento repetitivo y la prueba de sociabilidad *3-chamber* para estudiar la interacción social.

En la prueba de *self-grooming* los ratones transducidos con GFP, HA- β Nrx1 y HA- β Nrx1 Δ C presentaron el mismo tiempo total de acicalamiento e igual número de eventos (figura 69). Además, los valores obtenidos concuerdan con los datos de experimentos anteriores de ratones control que no habían sufrido el proceso de cirugía. Por este motivo, pensamos que la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C en las células del estriado dorsal no es suficiente para generar el incremento en comportamiento repetitivo que habíamos observado en el modelo β Nrx1 Δ C (figuras 34, 38).

En la fase de preferencia social de la prueba de sociabilidad *3-chamber* los ratones control infectados con GFP y HA- β Nrx1 interaccionaron significativamente más tiempo con el ratón que con el objeto (figura 69), reproduciendo la preferencia social observada en los ratones control de poblaciones anteriores (Figura 35, 38). En cambio, los ratones infectados con el mutante HA- β Nrx1 Δ C no reprodujeron los defectos asociados a la disfunción de β Nrxn observados en el ratón doble transgénico β Nrx1 Δ C,

puesto que interaccionaron significativamente más tiempo con el ratón que con el objeto (figura 69).

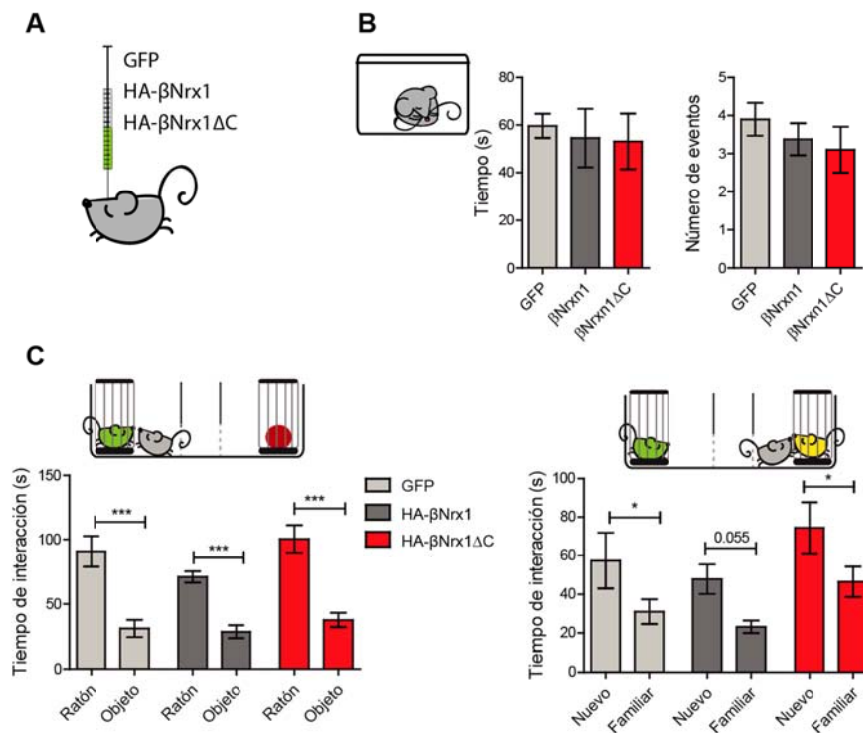


Figura 69. Análisis del comportamiento repetitivo y social en ratones con transducción lentiviral estereotáxica. A.- Los lentivirus utilizados codifican las proteínas GFP, HA-βNrx1 y HA-βNrx1ΔC. B.- Test de *self grooming*. Tiempo de acicalamiento (izquierda) y el número de eventos (derecha) C.- Prueba de sociabilidad *3-chamber*. Fase de preferencia social (izquierda) y preferencia por la novedad social (derecha). Análisis estadístico: *one-way* ANOVA (B); *two-way* ANOVA con medidas repetidas y *post hoc* de Bonferroni con comparaciones múltiples (C). **p-value* < 0.05; ****p-value* < 0.001. Todas las barras de error son SEM.

En conjunto, estos experimentos nos permiten concluir que la disfunción local de βNrxn en las neuronas del estriado dorsal no es suficiente para generar el comportamiento asociado al TEA. Estos datos, junto con la expresión observada del mutante en otras estructuras cerebrales del modelo βNrx1ΔC, como la corteza, apuntan a la disfunción de βNrxn en circuitos glutamatérgicos corticales como posible causa de los defectos de comportamiento asociado al autismo. Esta hipótesis podrá ser abordada en experimentos futuros destinados a inhibir localmente la función de βNrxn en otras estructuras cerebrales.

VI. DISCUSIÓN

1. Disfunción de circuitos postnatales como causa de los síntomas del autismo

Los pacientes con TEA se caracterizan por presentar patrones repetitivos y estereotipados de comportamiento y defectos en la interacción y comunicación social (APA, 2013). La aparición de los síntomas en la infancia temprana y el mantenimiento durante toda la vida adulta (APA, 2013) ha sugerido un defecto prenatal con manifestaciones postnatales permanentes como posible causa de esta enfermedad del neurodesarrollo. Otra posibilidad no excluyente es que los síntomas del autismo pudieran estar causados por una disfunción postnatal crónica de circuitos neuronales iniciada con la presentación de los síntomas en la infancia. Las *Nrxns* y otros genes cuyas mutaciones confieren susceptibilidad al TEA se expresan durante el desarrollo prenatal pero también durante la vida adulta (Ehrmann et al., 2013; Iijima et al., 2011). Por ello, el origen temporal del autismo no se ha resuelto y podría deberse a una combinación de ambas posibilidades (Hulbert et al., 2017). Por otra parte, las regiones cerebrales y los sustratos neuronales responsables del establecimiento de los síntomas asociados al TEA son desconocidos. A pesar de que el cerebro está interconectado y que por ello una sola región difícilmente sea la única responsable de una patología compleja, se ha sugerido que pueden existir nodos más vulnerables a las alteraciones genéticas con un rol clave en la regulación del comportamiento (Fuccillo, 2016). El esclarecimiento del patrón espacio-temporal responsable de la aparición y mantenimiento de los síntomas tiene repercusiones clínicas importantes, ya que puede ofrecer ventanas temporales e identificar circuitos neuronales para el tratamiento.

Alteraciones genéticas identificadas en pacientes con TEA han posicionado los genes de *NRXN1* y miembros de su ruta sináptica (*NLGN3* y *4*, *SHANK3*) como fuertes candidatos a contribuir en la fisiopatología del autismo (<https://sfari.org/>). Se han encontrado deleciones del gen *NRXN1* que afectan a isoformas α y β en pacientes con enfermedades del neurodesarrollo (Ching et al., 2010; Gauthier et al., 2011; Schaaf

et al., 2012; Szatmari et al., 2007). Concretamente, nuestro grupo ha identificado varias mutaciones independientes que afectan al codón de inicio específico de β Nrxn1, sin alterar a α Nrxn1, que reducen los niveles de la proteína en las sinapsis (Camacho-García et al., 2013, 2012). Aunque las mutaciones en *NRNX1* identificadas en pacientes son prácticamente privadas, estos datos apuntan a una hipo-función de β Nrxn1 como mecanismo subyacente al TEA.

Para dilucidar la cuestión espacio-temporal sobre el origen del autismo, en esta Tesis Doctoral hemos estudiado los efectos de la disfunción crónica de β Nrxn1 en circuitos postnatales sobre la aparición de un fenotipo asociado al autismo. Además, hemos abordado si la recuperación de la función de β Nrxn1 puede revertir los defectos relacionados con el autismo una vez que los síntomas se han manifestado.

Con la finalidad de modelar la disfunción de β Nrxn1 nuestro grupo generó el mutante HA- β Nrx1 Δ C. Esta construcción se diseñó como un dominante negativo de β Nrxn1 endógena, ya que posee el dominio extracelular de interacción transináptica pero carece del dominio intracelular, responsable de la señalización presináptica. Con esta aproximación se pretendió analizar de forma general la falta de función de β Nrxn1, más que ensayar una mutación privada concreta. Debido a la alta diversidad de isoformas de Nrxns (Schreiner et al., 2014) con funciones fundamentales no redundantes entre ellas (L. Y. Chen et al., 2017), la utilización de un dominante negativo de una isoforma concreta asociada a autismo representa una mayor especificidad que la generación de un KO que afecte a múltiples isoformas. Por otra parte, si bien los modelos KO representan una herramienta válida para el estudio biológico, aunque con limitaciones, es importante destacar que en humanos las mutaciones en *NRNX1* asociadas a autismo presentan penetrancia incompleta, aparecen en heterocigosis y no se han identificado “mutaciones KO” en pacientes.

La co-expresión de genes asociados con el autismo, así como evidencias de alteraciones anatómicas y de conectividad funcional en pacientes con TEA, apuntan a la corteza y estriado como nodos principales de afectación en el autismo (Chang et al., 2015; Fuccillo, 2016; Parikshak et al., 2013; Shepherd, 2013; Willsey et al., 2013). El estudio del patrón de expresión en diferentes regiones cerebrales de ratones adultos

demostró que la expresión mayoritaria de isoformas de *Nrxn1* que excluyen AS4 ocurre en regiones del prosencéfalo, incluidos corteza y estriado (Ehrmann et al., 2013). Estos datos indican un papel preponderante de β *Nrxn1*-AS4 en corteza y estriado. Por ello, para dirigir la expresión del mutante HA- β *Nrx1* Δ C a circuitos cortico-estriatales ya establecidos se utilizó el promotor CaMKII, que dirige la expresión postnatal a las neuronas principales del prosencéfalo (Mayford et al., 1996; Odeh et al., 2011). Consecuentemente, detectamos la expresión de HA- β *Nrx1* Δ C en neuronas piramidales corticales y en MSN del estriado a partir de la tercera semana postnatal, una vez ya se ha superado el periodo de mayor formación de sinapsis. En experimentos de inmunotinción observamos que la expresión de HA- β *Nrx1* Δ C excluye a las interneuronas de la corteza. En esta línea, resultados publicados durante la realización de esta Tesis han mostrado un enriquecimiento de las isoformas de *Nrxn1*-AS4 en neuronas piramidales y no en interneuronas de corteza e hipocampo (Nguyen et al., 2016), así como en las neuronas corticales de proyección (Fuccillo et al., 2015). Por ello, las consecuencias derivadas de la expresión del mutante de delección de β *Nrxn1* resultan de la disfunción postnatal de β *Nrxn1* en tipos celulares que presentan una elevada expresión de la proteína endógena y que forman parte de circuitos cerebrales con relevancia en autismo.

A pesar de que el mutante HA- β *Nrx1* Δ C no cumple el requisito de *construct validity*, puesto que las delecciones en *NRXN1* encontradas en pacientes con TEA afectan también al dominio transmembrana (Schaaf et al., 2012; Wiśniowiecka-Kowalnik et al., 2010), nuestros resultados de comportamiento demuestran que el ratón β *Nrx1* Δ C sí posee *face validity*, ya que reproduce fielmente las características comportamentales asociadas con los criterios diagnósticos del TEA (Pasciuto et al., 2015; Silverman et al., 2010). Los resultados comportamentales que validaron al ratón β *Nrx1* Δ C como modelo de autismo fueron un incremento en el comportamiento repetitivo de *self-grooming*, una pérdida de preferencia por la interacción social o por la novedad social en el test de *3-chamber* y un interés exagerado por estímulos no sociales frente a los sociales en la comunicación mediada por el olfato (test de habituación/deshabituación a la olfacción) (Rabaneda et al., 2014). Estos resultados se han obtenido en diferentes poblaciones de ratones machos y hembras β *Nrx1* Δ C, de manera robusta y mantenida

durante toda la vida adulta. De manera interesante, los cambios de comportamiento detectados en ratones β Nrx1 Δ C se restringieron a pruebas específicamente asociadas con los síntomas del TEA y no presentaron defectos en ensayos relacionados con locomoción, ansiedad o memoria.

Es importante destacar que a pesar de que numerosas mutaciones encontradas en pacientes con TEA afectan a β Nrxn1 y de que durante el transcurso de esta Tesis se han generado modelos animales deficientes en β Nrxns (Anderson et al., 2015; Aoto et al., 2013b; Aoto et al., 2015; Born et al., 2015; Chen et al., 2017), no se han desarrollado en ellos estudios de comportamiento en el contexto del autismo. Por otra parte, ratones deficientes en otros genes de Nrxns han sido analizados mediante pruebas relacionadas con el comportamiento asociado al autismo, pero ninguno muestra unos resultados tan convincentes como los que presenta el modelo β Nrx1 Δ C. El ratón KO α Nrxn1 presenta un incremento en *self-grooming* (Etherton et al., 2009), aunque posteriormente no ha sido reproducido dicho efecto (Grayton et al., 2013; Laarakker et al., 2012). Los ratones KO α Nrxn2 presentan defectos en interacción social —aunque no muy consistentes— y un comportamiento repetitivo en hembras (Born et al., 2015; Dachtler et al., 2014). La falta de similitud entre los resultados comportamentales realizados en otros ratones deficientes en Nrxns y el modelo β Nrx1 Δ C podría deberse a que están afectadas diferentes rutas de señalización sináptica y circuitos cerebrales; además, los modelos KO de Nrxns constitutivamente afectan a todas las células y están sujetos a procesos de compensación que puedan ocurrir durante el desarrollo. Más ampliamente evaluados en el contexto del autismo han sido los modelos animales deficientes en *Nlgn1*, *3* y *4*, aunque ninguno muestra simultáneamente un incremento de comportamiento repetitivo y defectos sociales, como sí lo hace el modelo β Nrx1 Δ C. Así por ejemplo, el modelo KO de *Nlgn1* muestra un incremento en *self-grooming* sin defectos sociales (Blundell et al., 2010). Además, existen fuertes conflictos por la falta de replicación de los resultados obtenidos en los modelos deficientes en NLs entre diferentes investigadores, como en el caso del KI R451C de *Nlgn3* y el KO de *Nlgn4* (Chadman et al., 2008; Ey et al., 2012; Jamain et al., 2008; Jaramillo et al., 2014; Tabuchi et al., 2007). Otros modelos animales relacionados con la ruta Nrxn/NL son los deficientes en los genes *Shank1-3*. A pesar de que existen

diferencias en los resultados obtenidos dependiendo de la escisión génica llevada a cabo, estos ratones KO muestran variablemente comportamiento repetitivo y defectos en el comportamiento social (Jaramillo et al., 2016, 2017; Jiang et al., 2013). Entre ellos destacan algunos modelos KO de *Shank3*, que presentan tal incremento de *self-grooming* que llegan a causarse lesiones en la piel (Peça et al., 2011; Schmeisser et al., 2012).

La presentación de los síntomas asociados al autismo durante toda la etapa adulta del modelo β Nrx1 Δ C como consecuencia de un defecto postnatal crónico en ausencia de afectación prenatal, sugiere que la disfunción persistente de β Nrxn1 es suficiente para causar el fenotipo. Aunque este hecho no descarta que un defecto prenatal de β Nrxn1 pudiera causar efectos similares asociados al TEA, incluso en estos casos la disfunción ocasionada por la mutación podría proseguir durante la vida adulta. Por ello, para poder analizar si la recuperación de la función de β Nrxn1 en ratones adultos mitiga el comportamiento asociado al autismo, el modelo β Nrx1 Δ C fue generado utilizando el sistema de expresión condicional Tet-off, que permite apagar la expresión del transgén con Dox. En experimentos de *western blot* hemos demostrado que el tratamiento con Dox apaga la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C a los pocos días de tratamiento. De manera consistente, el comportamiento repetitivo y los defectos de interacción social y comunicación social olfatoria del modelo β Nrx1 Δ C se revirtieron completamente incluso en ratones adultos de edad avanzada. Este resultado prueba que la disfunción postnatal de β Nrxn1 en circuitos cortico-estriatales recapitula los síntomas asociados con autismo, que pueden revertirse cuando la función normal de β Nrxn1 se re-establece (Rabaneda et al., 2014).

La reversión del fenotipo asociado al autismo no es una característica única de nuestro modelo β Nrx1 Δ C, sino que también se ha observado en otros modelos animales de autismo que han desafiado el concepto de irreversibilidad del TEA (Baudouin et al., 2012; Blundell et al., 2010; Gkogkas et al., 2013; Guy et al., 2007; McGraw et al., 2011; Mei et al., 2016; Peñarikano et al., 2011; Welch et al., 2007; Won et al., 2012). Estos hallazgos, junto con los desarrollados en esta Tesis Doctoral, suponen una esperanza para el desarrollo de terapias aplicables a pacientes con TEA una vez hayan desarrollado los síntomas. Las alteraciones genéticas de la ruta Nrxn/NL asociadas a

pacientes con TEA se encuentran en heterocigosis (Chen et al., 2014), por lo que la potenciación de la función del alelo no afectado podría ser suficiente para aliviar los síntomas. Además, la reversión del comportamiento asociado al autismo en ratones β Nrx1 Δ C de avanzada edad indica que los beneficios de posibles tratamientos para restaurar la disfunción de β Nrxn1 en TEA se podrían dirigir no sólo a niños, sino también a pacientes adultos.

2. Defectos sinápticos implicados en la generación del comportamiento asociado al autismo

Los resultados bioquímicos y electrofisiológicos obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que el mutante HA- β Nrx1 Δ C funciona como un dominante negativo de la función sináptica de β Nrxn1 AS4-, ya que el mutante se integra en circuitos sinápticos *in vivo*, se une a ligandos específicos de β Nrxn1 AS4- y causa una pérdida de función sináptica.

i) Mediante el fraccionamiento subcelular de sinaptosomas hemos demostrado que HA- β Nrx1 Δ C se expresa en el terminal presináptico. Debido a que las Nrxns se localizan mayoritariamente en el terminal presináptico (Dean et al., 2003; Taniguchi et al., 2007), la expresión del mutante afecta regiones subcelulares donde β Nrxn1 AS4- endógena realiza sus funciones principales. Además, este resultado demuestra que el dominio citoplásmico es dispensable para la localización de β Nrxn1 en la sinapsis, en contra de lo que algunos autores han postulado (Fairless et al., 2008). A favor de nuestros datos se ha demostrado que la ausencia del dominio citoplásmico de Nrxns no afecta al reclutamiento de vesículas sinápticas (Gokce et al., 2013). Por ello, pensamos que otras señales presentes en el dominio transmembrana o extracelular podrían dirigir β Nrxn1 hacia el terminal presináptico.

ii) Los experimentos de co-IP demostraron una interacción robusta y específica de HA- β Nrx1 Δ C con NL1 y no con otros candidatos. Este resultado concuerda con la afinidad preferencial que la isoforma β Nrxn1 AS4- muestra por las NLs, en el que NL1 ocupa el primer puesto mientras que presenta una afinidad reducida por el resto de isoformas (Comoletti et al., 2006; Koehnke et al., 2010). Por otra parte LRRTM2 también se une a

isoformas de Nrns AS4-, aunque recientemente se ha descrito que LRRTM2 presenta menor unión a β Nrxn1 que NL1 (Schreiner et al., 2015). Debido a que el nivel sináptico de β Nrxn1, NL1 u otras proteínas sinápticas analizadas no se vieron afectados en sinaptosomas por *western blot*, la interacción con NL1 apunta a una competición funcional de HA- β Nrx1 Δ C con la proteína β Nrxn1 AS4- endógena por la unión al mismo ligando postsináptico. Además, estos datos demuestran que la expresión del mutante de β Nrxn1 no afecta a las interacciones con ligandos postsinápticos de una manera indiscriminada, ni modifica la composición general de las sinapsis, indicando un efecto específico sobre sinapsis glutamatérgicas mediadas por NL1.

iii) El registro de actividad espontánea en las neuronas piramidales de la corteza permitió descubrir una reducción del 50% en la frecuencia de mEPSCs en los ratones β Nrx1 Δ C que no afectaba a la amplitud de las mismas (Rabaneda et al., 2014). Este resultado podría explicarse como un defecto en la liberación excitatoria presináptica, o alternativamente, por una reducción en el número de sinapsis glutamatérgicas. Por otra parte, el mismo tipo celular no presentó cambios significativos en la densidad de espinas dendríticas, analizadas mediante la tinción de Golgi-Cox. En consecuencia, estos datos apuntan a un defecto en la liberación presináptica de glutamato como causa de los defectos electrofisiológicos del modelo β Nrx1 Δ C. Además, esta observación concuerda con el descenso en la probabilidad de liberación vesicular que la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C provocó en cultivos neuronales, sin afectar en paralelo el reclutamiento de vesículas sinápticas.

El análisis de las entradas inhibitorias espontáneas en las neuronas piramidales corticales permitió detectar una reducción de un 30% en la frecuencia de mIPSCs. La reducción en la frecuencia de mIPSCs no se debe a una disfunción de β Nrxn1 en interneuronas corticales, que son negativas para la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C. Aunque el mecanismo responsable no es conocido, esta des-inhibición podría explicarse por un mecanismo homeostático que intentara compensar la pérdida de excitación global del circuito (Lau et al., 2012).

La disminución de la liberación presináptica en el modelo β Nrx1 Δ C está en línea con otros trabajos que demuestran que la disfunción de Nrns provoca defectos sobre la

neurotransmisión. La expresión de un mutante de β Nrxn1 equivalente a HA- β Nrx1 Δ C produce una menor probabilidad de liberación en rodajas de hipocampo (Futai et al., 2007). Datos recientes de nuestro grupo indican que la actividad de β Nrxns está regulada por un mecanismo transináptico mediado por NL1, de manera que la sobreexpresión de NL1 en el terminal postsináptico aumenta la liberación vesicular y el influjo de calcio en los terminales opuestos (Servián-Morilla et al., en revisión). Estos datos explican por qué la expresión de β Nrxn1 mostrada en los Antecedentes de esta Tesis no resultó en ningún efecto presináptico, a diferencia de la expresión del mutante que carece del dominio de delección (Futai et al., 2007; Rabaneda et al., 2014). Además, diversos modelos de ratón deficientes en la expresión de genes de Nrxns muestran también un efecto en la función sináptica que depende del gen afectado. El ratón KO α Nrxn1 presenta una reducción de la frecuencia de mEPSCs sin tener alterada la frecuencia de mIPSCs ni la amplitud de ninguna de las dos (M. R. Etherton et al., 2009). La delección de α Nrx2 provoca un descenso en la frecuencia de mEPSCs sin afectar a la transmisión inhibitoria (Born et al., 2015). En cambio, el modelo KO Nrxn3 muestra defectos de transmisión inhibitoria en el bulbo olfatorio, con una menor frecuencia de mIPSCs dependiente del dominio intracelular (Aoto et al., 2015). El ratón TKO α Nrxn1-3, que mantiene la expresión de β Nrxns, sufre una reducción en la frecuencia de mEPSCs y mIPSCs sin afectar la amplitud de las mismas, junto con una reducción en el número de sinapsis inhibitorias (Markus Missler et al., 2003). Si bien al inicio de esta Tesis Doctoral no existía ningún modelo deficiente en genes de β Nrxn, recientemente se ha publicado el TKO β Nrxn1-3 que afecta a todas las isoformas de β Nrxns indiscriminadamente (Anderson et al., 2015) y el KO total α y β Nrxn1-3 (Chen et al., 2017). La ausencia de β Nrxns en cultivos del ratón TKO β Nrxn1-3 reduce drásticamente la frecuencia de mEPSCs, mientras que deja intacta la de mIPSCs (Anderson et al., 2015), indicando un papel preponderante de β Nrxns en las sinapsis excitatorias. Por otra parte, la delección condicional de todas las Nrxns en el modelo KO total de α y β Nrxn1-3 afecta la transmisión excitatoria cuando la disfunción está dirigida a sinapsis excitatorias y una menor transmisión inhibitoria, con menor frecuencia de mIPSCs cuando se dirige a sinapsis inhibitorias (Chen et al., 2017). Estos trabajos ejemplifican la heterogeneidad y el solapamiento parcial de función entre

isoformas de Nrns en sinapsis y circuitos concretos y resalta la importancia de dirigir la disfunción a sustratos específicos. Así, el efecto del silenciamiento de genes de Nrns se puede ver enmascarado en sinapsis donde se expresen genes con función solapante o resultar en efectos diferenciales dependiendo de la región afectada. Por ello, el empleo de mutantes con función dominante negativa resulta de utilidad para afectar la función de isoformas concretas sin alterar los niveles de expresión de los genes endógenos. En este sentido, es muy llamativo que el defecto electrofisiológico en sinapsis glutamatérgicas del TKO de $\beta Nr1-3$ se rescata con la incorporación específica de la isoforma $\beta Nr1$ AS4- y no con otras isoformas (Anderson et al., 2015). Esta reversión, junto con los resultados obtenidos en Tesis Doctoral, demuestran el papel esencial que juega la isoforma $\beta Nr1$ AS4- en la transmisión sináptica y especialmente en la funcionalidad de las sinapsis glutamatérgicas.

3. Identificación de mecanismos afectados como posibles dianas terapéuticas para el TEA

La reversibilidad del fenotipo asociado al autismo en modelos animales adultos amplía las oportunidades para el tratamiento del TEA. El conocimiento de los mecanismos responsables de este comportamiento podría conducir al desarrollo de terapias que los corrijan. Con este objetivo, en esta Tesis Doctoral hemos analizado rutas candidatas de estar afectadas en el modelo $\beta Nr1\Delta C$, como la señalización mediada por eCBs y los cambios de expresión génica.

Recientemente se ha publicado que el TKO $\beta Nr1-3$ presenta alteraciones en la señalización tónica de eCBs, con una hiperproducción de 2-AG (Anderson et al., 2015). Sin embargo, en machos y hembras del modelo $\beta Nr1\Delta C$, los niveles de 2-AG y AEA no mostraron alteraciones. La aparente discordancia entre nuestros resultados y Anderson et al. (2015) podría ser explicada por las diferencias en el abordaje utilizado para generar la disfunción de $\beta Nrns$. De hecho, al contrario que el TKO $\beta Nr1-3$, el dominante negativo HA- $\beta Nr1\Delta C$ no inhibe la expresión de $\beta Nr1$ endógena. Debido a que no se ha descrito el mecanismo por el cual las $\beta Nrns$ podrían provocar un freno sobre la producción de 2-AG (Anderson et al., 2015), sería posible que el mutante HA-

β Nrx1 Δ C no actuara como un dominante negativo en dicho proceso. Podría darse la situación, por otro lado, de que el ratón β Nrx1 Δ C sufriera cambios en la señalización tónica de eCBs sin cambios en la concentración de los compuestos eCBs. En esta línea, los experimentos de Anderson et al. (2015) no se basan en un análisis directo de la concentración de 2-AG, sino que utilizan herramientas farmacológicas que afectan la actividad de efectores de la ruta. Por último, debido a la escasa producción de eCBs en situación basal, podríamos perder cambios en la concentración de los mismos por falta de sensibilidad en la técnica utilizada. Aunque consideramos esta posibilidad poco probable porque el método de cuantificación permitió detectar reducciones en eCB muy poco abundantes (AEA en machos y hembras), los resultados preliminares de nuestro experimento de iTRAQ en sinaptosomas mostraron un descenso en proteínas activadoras de la ruta de síntesis (mGlu₁) y un aumento en las enzimas de degradación de eCBs (FAAH) que apuntaban a una reducción en los niveles de estos compuestos, si bien es verdad que este abordaje no descubrió cambios sinápticos existentes, como el incremento de Igsf9b. Por lo tanto, métodos que analicen la actividad de las proteínas de señalización del sistema eCB, o determinaciones de los compuestos eCBs tras tratamientos farmacológicos que provoquen un incremento en los mismos, podrían resolver estas cuestiones en el modelo β Nrx1 Δ C.

Los cambios de actividad sináptica pueden llevar a cambios en la expresión génica, por lo que analizamos el transcriptoma del modelo β Nrx1 Δ C. El análisis masivo mostró algunas alteraciones en la expresión de genes clasificados como falsos positivos, ya que se debían directa o indirectamente a la inserción de los transgenes TRE-HA- β Nrx1 Δ C o CaMKII-tTA. Por otra parte, este abordaje nos permitió identificar genes regulados por la expresión de la proteína HA- β Nrx1 Δ C en el estriado, entre los que destacó un subgrupo clasificados como IEG. El incremento detectado en los niveles del mRNA de *Arc*, *Fos* y *Nr4a1* apunta a que la disfunción de β Nrxn genera una desregulación de la actividad sináptica que modula programas de expresión génica en el estriado de los ratones β Nrx1 Δ C. Numerosos estudios han encontrado defectos en el balance E/I en pacientes y modelos animales de autismo (Gibson et al., 2008), por lo que se ha propuesto una alteración en la homeostasis de la actividad sináptica como mecanismo subyacente al TEA (Bourgeron, 2009; Ebert et al., 2013).

De modo interesante, el aumento de la expresión de Arc se ha relacionado con TEA de tipo sindrómico, sugiriendo una conexión entre formas no sindrómicas y sindrómicas de autismo. El síndrome X frágil se produce por mutaciones en el gen *FMRP* (de sus siglas en inglés *Fragile-X mental retardation protein 1*), que codifica una proteína inhibidora de la traducción de Arc. En el Síndrome de Angelman la causa genética más establecida son deleciones o mutaciones con pérdida de función en *UBE3A*, que codifica una ubiquitina ligasa que marca Arc para su degradación (Sztainberg et al., 2016). Por ello, mutaciones en *FMRP* y en *UBE3A* asociadas a formas sindrómicas de autismo resultan en un aumento en los niveles de Arc.

Cabe destacar que hemos analizado el aumento en la expresión de IEG únicamente en muestras de estriado. Sin embargo, posiblemente la actividad neuronal también esté desbalanceada en otras regiones cerebrales que expresan el mutante HA- β Nrx1 Δ C, como la corteza. Esta idea concuerda con la existencia de defectos electrofisiológicos en neuronas piramidales corticales de los ratones β Nrx1 Δ C, aunque deberá ser analizado directamente en muestras corticales a diferentes niveles, mRNA y proteína.

4. Disección de circuitos cerebrales implicados en la interacción social y en el establecimiento de comportamientos asociados al autismo

Uno de los retos más importantes en Neurociencias es relacionar una conducta a un circuito sináptico concreto. En este sentido, la expresión del transgén en nuestro ratón modelo β Nrx1 Δ C apunta a la corteza y al estriado postnatal como las regiones cerebrales implicadas en los síntomas relacionados con el autismo. Para profundizar en la identificación de los circuitos sinápticos relacionados en el comportamiento social realizamos un registro de LFP en regiones de la corteza y el estriado *in vivo*, mientras los ratones realizaban el test de sociabilidad en el aparato de *3-chamber*. Estos experimentos se realizaron en ratones control para descubrir patrones de actividad normal relacionados con la interacción social y se compararon con el modelo de autismo β Nrx1 Δ C. Este abordaje permitió descubrir patrones de actividad cerebral específicos de la interacción social, mediante la comparación del registro obtenido en

animales control durante la interacción social (con un ratón), que desaparecían en ratones β Nrx1 Δ C.

La firma social más llamativa fue un incremento específico en el poder espectral de la banda de frecuencia delta en PrL y CPU de ratones control. Durante el desarrollo de estos experimentos se ha publicado un estudio que analiza la actividad de neuronas individuales durante la interacción social, evaluada en un aparato similar a un *3-chamber* sin paredes (Lee et al., 2016). Los autores describen que un subgrupo de neuronas de la corteza prefrontal presenta mayores tasas de descarga durante la interacción social (Lee et al., 2016). A pesar de las diferencias en el tipo de técnica utilizada, los resultados de Lee et al. (2016) podrían estar relacionados con el incremento de actividad delta en la corteza prefrontal observado durante la interacción social en nuestro experimento. Incrementos en la actividad delta se han asociado al control temporal de ejecuciones en respuesta a estímulos (Donnelly et al., 2014; Parker et al., 2015) y a la coordinación de actividad entre áreas corticales distantes durante la toma de decisiones (Nácher et al., 2013). Nuestros resultados sugieren su implicación adicional durante la interacción social.

De modo confirmatorio, el incremento de actividad delta en PrL y CPU no se produjo en el modelo de autismo β Nrx1 Δ C. A diferencia de los ratones control, la actividad delta en PrL y CPU de los ratones β Nrx1 Δ C se mantuvo al mismo nivel durante las interacciones con el objeto y con el ratón. Este hallazgo se encuentra asociado con la falta de interacción preferencial con el ratón que presentan los ratones β Nrx1 Δ C. Estos datos indican la importancia de la funcionalidad de β Nrxns durante la actividad neuronal propia del comportamiento social. Debido a la prácticamente nula expresión del dominante negativo HA- β Nrx1 Δ C en PrL y a su función presináptica, estos datos indican que el efecto podría estar mediado por proyecciones neuronales desde otras áreas corticales, como la corteza cingulada o somatosensorial que presentan una elevada expresión del mutante. Además, como ya hemos explicado, las neuronas de proyección de la corteza somatosensorial presentaron una reducción en la frecuencia de mEPSCs y mIPSCs, por lo que sus proyecciones están presumiblemente afectadas por un desbalance E/I. En esta línea, se ha descrito que el desbalance E/I en la corteza prefrontal generado mediante estimulación optogenética provoca defectos en

comportamiento social (Yizhar et al., 2011). Por otra parte, el estriado, que presentó un mayor incremento de actividad delta durante la interacción social, sí presenta una elevada expresión del dominante negativo HA- β Nrx1 Δ C. Sin embargo, la disfunción de β Nrxns restringida a neuronas estriatales mediante inyección lentiviral del mutante HA- β Nrx1 Δ C no derivó en la presentación de un fenotipo asociado al autismo en comportamiento repetitivo o en interacción social. Este resultado sugiere que la alteración de actividad de LFP registrada en CPu podría ser secundaria a la expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C en las proyecciones que inervan el estriado, como las neuronas piramidales corticales. Esta posibilidad podrá ser evaluada en experimentos futuros mediante la expresión lentiviral del mutante HA- β Nrx1 Δ C en regiones corticales combinada con registros de LFP y comportamiento. En apoyo a esta estrategia, otros estudios han demostrado que la manipulación génica mediante inyección viral en regiones concretas puede generar comportamiento asociado al autismo (Rothwell et al., 2014) e incluso revertirlo (Welch et al., 2007).

Además de la inhibición en el incremento de las ondas delta durante la interacción social, los ratones β Nrx1 Δ C mostraron una reducción en la potencia espectral de las bandas beta y gamma en todas las áreas registradas, así como una reducción generalizada en todas las bandas de frecuencia en S1BF. Se necesitan experimentos adicionales para saber si estos defectos están relacionados con las alteraciones sociales o con otras conductas afectadas en el ratón β Nrx1 Δ C, como por ejemplo, el aumento en el comportamiento repetitivo.

5. Modelo de trabajo

En conjunto, los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral contribuyen a la caracterización de la función de los circuitos mediados por β Nrxn1 implicados en la interacción social y su disfunción en enfermedades mentales como el TEA. Los datos recogidos se podrían resumir en el siguiente modelo de trabajo (Figura 70):

La disfunción crónica de β Nrxns en circuitos postnatales del prosencéfalo es suficiente para el desarrollo de un comportamiento asociado al autismo. Los defectos conductuales se mantienen durante la vida adulta y se pueden revertir completamente

a cualquier edad cuando se recupera la función normal de β Nrxns. La disfunción de β Nrxns afecta directamente a las sinapsis glutamatérgicas mediadas por NL1 en la corteza y estriado sin alterar la densidad de espinas dendríticas en dichas estructuras. Sin embargo, la interacción del mutante de β Nrxn1 con NL1 produce una marcada reducción en la transmisión excitatoria que puede explicarse por una inhibición en la probabilidad de liberación causada por la ausencia del dominio citoplásmico. De esta forma, el descenso de la excitación de las neuronas piramidales sobre las interneuronas corticales puede provocar una desinhibición que podría explicar el descenso de la actividad gamma y el aumento en la expresión de IEG. La expresión del mutante de β Nrxn1 en el estriado no es suficiente para recapitular los defectos conductuales asociados a autismo, sugiriendo la participación de estructuras cerebrales jerárquicamente superiores.

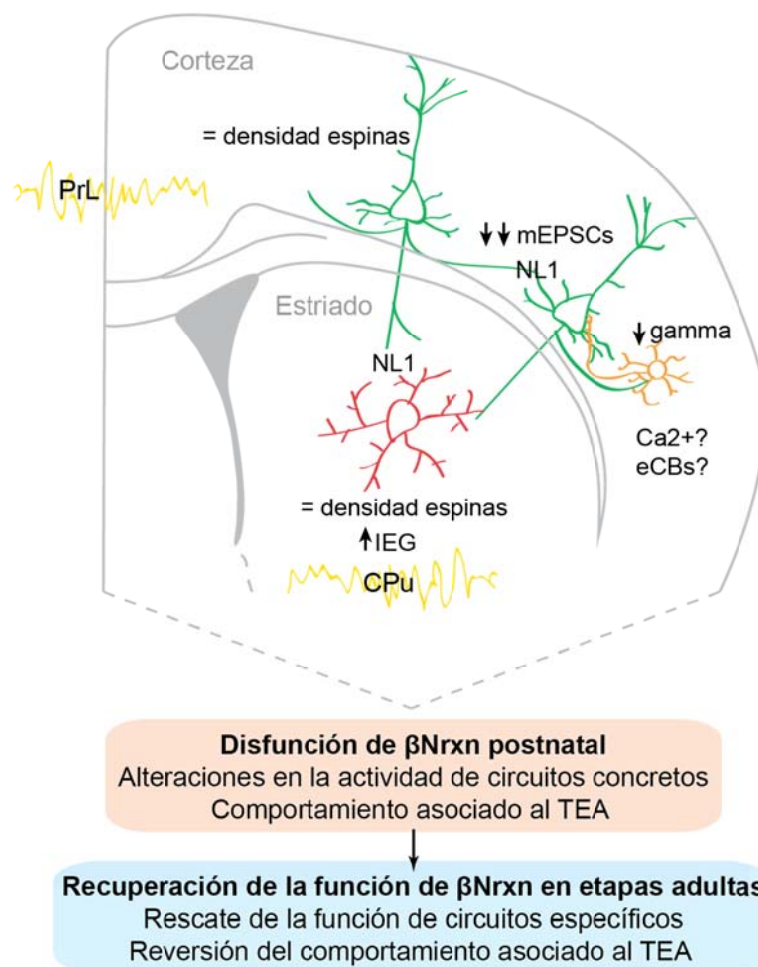


Figura 70. Modelo de trabajo. Se indican las principales alteraciones detectadas en las diferentes estructuras cerebrales en el modelo de autismo β Nrx1 Δ C. Por simplificación no se representan todos los tipos neuronales. Verde- neuronas piramidales corticales; naranja- ejemplo de interneurona cortical; rojo- MSN; amarillo- simboliza el patrón de LFP alterado en PrL (situada en coordenadas anteriores al corte mostrado) y CPu.

VII. CONCLUSIONES

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

1- El mutante HA- β Nrx1 Δ C, que carece del dominio citoplásmico de β Nrxn1, se expresa en el ratón β Nrx1 Δ C en neuronas principales de la corteza y estriado a partir de la tercera semana postnatal. La localización del mutante HA- β Nrx1 Δ C es mayoritaria en fracciones presinápticas.

2- La expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C produce una reducción en la frecuencia de mEPSCs sobre las neuronas piramidales corticales sin reducir el número de sinapsis excitatorias ni generar cambios en la composición general de la sinapsis.

3- Entre los diferentes ligandos postinápticos, el mutante HA- β Nrx1 Δ C se asocia a NL1 en corteza y estriado.

4- La expresión del mutante HA- β Nrx1 Δ C provoca la aparición de un fenotipo asociado al autismo caracterizado por un incremento en comportamiento repetitivo y defectos en la interacción social y en la comunicación social que se mantiene durante toda la etapa adulta.

5- La inhibición de la expresión del mutante de β Nrxn1 es suficiente para revertir los defectos de comportamiento, incluso en ratones de edad avanzada, indicando que la disfunción continua de β Nrxn1 es responsable del fenotipo asociado al autismo.

6- La expresión de genes dependientes de actividad podría participar en la desregulación sináptica ocasionada por la disfunción de β Nrxn1.

7- La interacción social incrementa la actividad de las ondas delta en la corteza prefrontal y el estriado, pero no en la corteza somatosensorial. Este incremento en las ondas delta se inhibe en los ratones β Nrx1 Δ C.

8- La pérdida de actividad de la banda de frecuencia gamma en ratones β Nrx1 Δ C sugiere una desinhibición local de los circuitos cortico-estriatales.

9- La disfunción de β Nrxn1 dirigida a neuronas del estriado no recapitula los defectos de comportamiento asociados al autismo del ratón β Nrx1 Δ C, apuntando a circuitos corticales como responsables del fenotipo.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Benito, E., & Barco, A. (2015). The neuronal activity-driven transcriptome. *Molecular Neurobiology*, 51(3), 1071-1088. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8772-z>
- Berger, J. M., Rohn, T. T., & Oxford, J. T. (2013). Autism as the Early Closure of a Neuroplastic Critical Period Normally Seen in Adolescence. *Biological systems, open access*, 1. <https://doi.org/10.4172/2329-6577.1000118>
- Bicks, L. K., Koike, H., Akbarian, S., & Morishita, H. (2015). Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man. *Frontiers in Psychology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01805>
- Blundell, J., Blaiss, C. A., Etherton, M. R., Espinosa, F., Tabuchi, K., Walz, C., ... Powell, C. M. (2010). Neuroligin 1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(6), 2115-2129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4517-09.2010>
- Born, G., Breuer, D., Wang, S., Rohlmann, A., Coulon, P., Vakili, P., ... Missler, M. (2014). Modulation of synaptic function through the α -neurexin-specific ligand neurexophilin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(13), E1274-1283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312112111>
- 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 alpha- and beta-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. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(12), 9399-9413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318659>
- Bourgeron, T. (2009). A synaptic trek to autism. *Current Opinion in Neurobiology*, 19(2), 231-234. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.06.003>
- Bozdagi, O., Sakurai, T., Papapetrou, D., Wang, X., Dickstein, D. L., Takahashi, N., ... Buxbaum, J. D. (2010). Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Molecular Autism*, 1(1), 15. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-1-15>

- Buczynski, M. W., & Parsons, L. H. (2010). Quantification of brain endocannabinoid levels: methods, interpretations and pitfalls. *British Journal of Pharmacology*, *160*(3), 423-442. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00787.x>
- Budreck, E. C., & Scheiffele, P. (2007). Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *The European Journal of Neuroscience*, *26*(7), 1738-1748. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05842.x>
- Butz, S., Okamoto, M., & Südhof, T. C. (1998). A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell*, *94*(6), 773-782.
- Buzsáki, G. (2006). *Rhythms of the Brain* (Vol. 1). 198 Madison Avenue, New York, New York 10016: Oxford University Press.
- Camacho-Garcia, R. J. a, Hervas, A. c, Toma, C. d, Balmana, N. c, Cormand, B. d, Martinez-Mir, A. a, & Scholl, F. G. a. (2013). Rare variants analysis of neurexin-1[beta] 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., ... 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>
- Casanova, E. L., Sharp, J. L., Chakraborty, H., Sumi, N. S., & Casanova, M. F. (2016). Genes with high penetrance for syndromic and non-syndromic autism typically function within the nucleus and regulate gene expression. *Molecular Autism*, *7*. <https://doi.org/10.1186/s13229-016-0082-z>
- Casanova, M. F., El-Baz, A., Vanbogaert, E., Narahari, P., & Switala, A. (2010). A topographic study of minicolumnar core width by lamina comparison between autistic subjects and controls: possible minicolumnar disruption due to an anatomical element in-common to multiple laminae. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *20*(2), 451-458. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00319.x>
- Castillo, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E., & Hashimoto-dani, Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, *76*(1), 70-81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020>
- Chadman, K. K., Gong, S., Scattoni, M. L., Boltuck, S. E., Gandhi, S. U., Heintz, N., & Crawley, J. N. (2008). Minimal aberrant behavioral phenotypes of neuroligin-3 R451C knockin mice. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, *1*(3), 147-158. <https://doi.org/10.1002/aur.22>

- Chang, J., Gilman, S. R., Chiang, A. H., Sanders, S. J., & Vitkup, D. (2015). Genotype to phenotype relationships in autism spectrum disorders. *Nature Neuroscience*, *18*(2), 191-198. <https://doi.org/10.1038/nn.3907>
- Chen, J., Yu, S., Fu, Y., & Li, X. (2014). Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 276. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00276>
- Chen, L. Y., Jiang, M., Zhang, B., Gokce, O., & Südhof, T. C. (2017). Conditional Deletion of All Neurexins Defines Diversity of Essential Synaptic Organizer Functions for Neurexins. *Neuron*, *94*(3), 611-625.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.011>
- 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., ... Children's Hospital Boston Genotype Phenotype Study Group. (2010). Deletions of NRXN1 (neurexin-1) predispose to a wide spectrum of developmental disorders. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, *153B*(4), 937-947. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31063>
- Chowdhury, S., Shepherd, J. D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R. S., Plath, N., ... Worley, P. F. (2006). Arc/Arg3.1 Interacts with the Endocytic Machinery to Regulate AMPA Receptor Trafficking. *Neuron*, *52*(3), 445-459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.033>
- Christensen, D. L., Baio, J., Van Naarden Braun, K., Bilder, D., Charles, J., Constantino, J. N., ... Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2016). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries (Washington, D.C.: 2002)*, *65*(3), 1-23. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6503a1>
- 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>
- Cohen, S., & Greenberg, M. E. (2008). Communication Between the Synapse and the Nucleus in Neuronal Development, Plasticity, and Disease. *Annual review of cell and*

- developmental biology*, 24, 183-209.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175235>
- Comoletti, D., Flynn, R. E., Boucard, A. A., Demeler, B., Schirf, V., Shi, J., ... Taylor, P. (2006). Gene Selection, Alternative Splicing, and Post-translational Processing Regulate Neuroligin Selectivity for β -Neurexins. *Biochemistry*, 45(42), 12816-12827.
<https://doi.org/10.1021/bi0614131>
- Corradetti, M. N., Inoki, K., & Guan, K.-L. (2005). The Stress-induced Proteins RTP801 and RTP801L Are Negative Regulators of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 9769-9772.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C400557200>
- Cox, W. (1891). Impragnation des centralen nervensystems mit Quecksilbersalzen. *Arch Mikr Anat*, 98, 327.
- Crawley, J. N. (2007). Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 17(4), 448-459. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00096.x>
- Crawley, J. N. (2012). Translational animal models of autism and neurodevelopmental disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14(3), 293-305.
- Dabell, M. P., Rosenfeld, J. A., Bader, P., Escobar, L. F., El-Khechen, D., Vallee, S. E., ... Shaffer, L. G. (2013). Investigation of NRXN1 deletions: clinical and molecular characterization. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 161A(4), 717-731.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35780>
- Dachtler, J., Glasper, J., Cohen, R. N., Ivorra, J. L., Swiffen, D. J., Jackson, A. J., ... Clapcote, S. J. (2014). Deletion of α -neurexin II results in autism-related behaviors in mice. *Translational Psychiatry*, 4, e484. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.123>
- De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., Samocha, K., Cicek, A. E., ... Buxbaum, J. D. (2014). Synaptic, transcriptional, and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, 515(7526), 209-215. <https://doi.org/10.1038/nature13772>
- de Wit, J., O'Sullivan, M. L., Savas, J. N., Condomitti, G., Caccese, M. C., Vennekens, K. M., ... Ghosh, A. (2013). Unbiased discovery of glypican as a receptor for LRRTM4 in regulating excitatory synapse development. *Neuron*, 79(4), 696-711.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.049>
- de Wit, J., Sylwestrak, E., O'Sullivan, M. L., Otto, S., Tiglio, K., Savas, J. N., ... Ghosh, A. (2009). LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation. *Neuron*, 64(6), 799-806. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.019>

- 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. <https://doi.org/10.1038/nn1074>
- DeNardo, L. A., Berns, D. S., DeLoach, K., & Luo, L. (2015). Connectivity of mouse somatosensory and prefrontal cortex examined with trans-synaptic tracing. *Nature Neuroscience*, *18*(11), 1687-1697. <https://doi.org/10.1038/nn.4131>
- Di Martino, A., Kelly, C., Grzadzinski, R., Zuo, X.-N., Mennes, M., Mairena, M. A., ... Milham, M. P. (2011). Aberrant striatal functional connectivity in children with autism. *Biological Psychiatry*, *69*(9), 847-856. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.10.029>
- Donnelly, N. A., Holtzman, T., Rich, P. D., Nevado-Holgado, A. J., Fernando, A. B. P., Van Dijck, G., ... Dalley, J. W. (2014). Oscillatory activity in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens correlates with impulsivity and reward outcome. *PLoS One*, *9*(10), e111300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111300>
- Ebert, D. H., & Greenberg, M. E. (2013). Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. *Nature*, *493*(7432), 327-337. <https://doi.org/10.1038/nature11860>
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., & Yakhini, Z. (2009). GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*, *10*, 48. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-48>
- Ehrmann, I., Dalgliesh, C., Liu, Y., Danilenko, M., Crosier, M., Overman, L., ... Elliott, D. J. (2013). The Tissue-Specific RNA Binding Protein T-STAR Controls Regional Splicing Patterns of Neurexin Pre-mRNAs in the Brain. *PLoS Genetics*, *9*(4), e1003474. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003474>
- Erzurumlu, R. S., & Gaspar, P. (2012). Development and Critical Period Plasticity of the Barrel Cortex. *The European Journal of Neuroscience*, *35*(10), 1540-1553. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08075.x>
- Etherton, M., Földy, C., Sharma, M., Tabuchi, K., Liu, X., Shamloo, M., ... 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>
- Etherton, M. R., Blaiss, C. A., Powell, C. M., & Südhof, T. C. (2009). Mouse neurexin-1alpha deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(42), 17998-18003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910297106>

- Ey, E., Yang, M., Katz, A. M., Woldeyohannes, L., Silverman, J. L., Leblond, C. S., ... Crawley, J. N. (2012). Absence of deficits in social behaviors and ultrasonic vocalizations in later generations of mice lacking neuroligin4. *Genes, Brain, and Behavior*, *11*(8), 928-941. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00849.x>
- Fairless, R., Masius, H., Rohlmann, A., Heupel, K., Ahmad, M., Reissner, C., ... Missler, M. (2008). Polarized Targeting of Neurexins to Synapses Is Regulated by their C-Terminal Sequences. *Journal of Neuroscience*, *28*(48), 12969-12981. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5294-07.2008>
- Flavell, S. W., & Greenberg, M. E. (2008). Signaling Mechanisms Linking Neuronal Activity to Gene Expression and Plasticity of the Nervous System. *Annual review of neuroscience*, *31*, 563-590. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631>
- Földy, C., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2013). Autism-associated neuroligin-3 mutations commonly disrupt tonic endocannabinoid signaling. *Neuron*, *78*(3), 498-509. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.036>
- Folstein, S., & Rutter, M. (1977). Infantile Autism: A Genetic Study of 21 Twin Pairs. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, *18*(4), 297-321. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.1977.tb00443.x>
- Frazier, T. W., Georgiades, S., Bishop, S. L., & Hardan, A. Y. (2014). Behavioral and Cognitive Characteristics of Females and Males With Autism in the Simons Simplex Collection. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, *53*(3), 329-340.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2013.12.004>
- Froemke, R. C., & Schreiner, C. E. (2015). Synaptic plasticity as a cortical coding scheme. *Current Opinion in Neurobiology*, *35*, 185-199. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.10.003>
- Fuccillo, M. V. (2016). Striatal Circuits as a Common Node for Autism Pathophysiology. *Frontiers in Neuroscience*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00027>
- Fuccillo, M. V., Földy, C., Gökce, Ö., Rothwell, P. E., Sun, G. L., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2015). Single-Cell mRNA Profiling Reveals Cell-Type-Specific Expression of Neurexin Isoforms. *Neuron*, *87*(2), 326-340. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.028>
- Furth, P. A., St Onge, L., Böger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., ... Hennighausen, L. (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(20), 9302-9306.

- Futai, K., Doty, C. D., Baek, B., Ryu, J., & Sheng, M. (2013). Specific trans-synaptic interaction with inhibitory interneuronal neurexin underlies differential ability of neuroligins to induce functional inhibitory synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(8), 3612-3623. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1811-12.2013>
- Futai, K., Kim, M. J., Hashikawa, T., Scheiffele, P., Sheng, M., & Hayashi, Y. (2007). Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neuroligin. *Nature Neuroscience*, *10*(2), 186-195. <https://doi.org/10.1038/nn1837>
- 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>
- Gauthier, J., Siddiqui, T. J., Huashan, P., Yokomaku, D., Hamdan, F. F., Champagne, N., ... 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>
- Gibson, J. R., Bartley, A. F., Hays, S. A., & Huber, K. M. (2008). Imbalance of Neocortical Excitation and Inhibition and Altered UP States Reflect Network Hyperexcitability in the Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Journal of Neurophysiology*, *100*(5), 2615-2626. <https://doi.org/10.1152/jn.90752.2008>
- Gkogkas, C. G., Khoutorsky, A., Ran, I., Rampakakis, E., Nevarko, T., Weatherill, D. B., ... Sonenberg, N. (2013). Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature*, *493*(7432), 371-377. <https://doi.org/10.1038/nature11628>
- Glaser, E. M., & Van der Loos, H. (1981). Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *Journal of Neuroscience Methods*, *4*(2), 117-125.
- Gokce, O., & Südhof, T. C. (2013). Membrane-Tethered Monomeric Neurexin LNS-Domain Triggers Synapse Formation. *The Journal of Neuroscience*, *33*(36), 14617-14628. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1232-13.2013>
- Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(12), 5547-5551.

- Gotts, S. J., Simmons, W. K., Milbury, L. A., Wallace, G. L., Cox, R. W., & Martin, A. (2012). Fractionation of social brain circuits in autism spectrum disorders. *Brain: A Journal of Neurology*, *135*(Pt 9), 2711-2725. <https://doi.org/10.1093/brain/aws160>
- 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>
- Grayton, H. M., Missler, M., Collier, D. A., & Fernandes, C. (2013). Altered social behaviours in neurexin 1 α knockout mice resemble core symptoms in neurodevelopmental disorders. *PLoS One*, *8*(6), e67114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067114>
- Guo, Q., Wang, D., He, X., Feng, Q., Lin, R., Xu, F., ... Luo, M. (2015). Whole-Brain Mapping of Inputs to Projection Neurons and Cholinergic Interneurons in the Dorsal Striatum. *PLoS ONE*, *10*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123381>
- Guy, J., Gan, J., Selfridge, J., Cobb, S., & Bird, A. (2007). Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5815), 1143-1147. <https://doi.org/10.1126/science.1138389>
- Halladay, A. K., Bishop, S., Constantino, J. N., Daniels, A. M., Koenig, K., Palmer, K., ... Szatmari, P. (2015). Sex and gender differences in autism spectrum disorder: summarizing evidence gaps and identifying emerging areas of priority. *Molecular Autism*, *6*. <https://doi.org/10.1186/s13229-015-0019-y>
- Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews. Neuroscience*, *6*(11), 877-888. <https://doi.org/10.1038/nrn1787>
- Hulbert, S. W., & Jiang, Y. (2017). Cellular and Circuitry Bases of Autism: Lessons Learned from the Temporospacial Manipulation of Autism Genes in the Brain. *Neuroscience Bulletin*, *33*(2), 205-218. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0112-7>
- Hutsler, J. J., & Casanova, M. F. (2016). Review: Cortical construction in autism spectrum disorder: columns, connectivity and the subplate. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *42*(2), 115-134. <https://doi.org/10.1111/nan.12227>
- Hutsler, J. J., & Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Research*, *1309*, 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.120>
- Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., & Südhof, T. C. (1995). Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell*, *81*(3), 435-443.

- Iijima, T., Iijima, Y., Witte, H., & Scheiffele, P. (2014). Neuronal cell type-specific alternative splicing is regulated by the KH domain protein SLM1. *The Journal of Cell Biology*, 204(3), 331-342. <https://doi.org/10.1083/jcb.201310136>
- Iijima, T., Wu, K., Witte, H., Hanno-Iijima, Y., Glatter, T., Richard, S., & Scheiffele, P. (2011). SAM68 regulates neuronal activity-dependent alternative splicing of neurexin-1. *Cell*, 147(7), 1601-1614. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.028>
- Iossifov, I., O'Roak, B. J., Sanders, S. J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., ... Wigler, M. (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, 515(7526), 216-221. <https://doi.org/10.1038/nature13908>
- Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., ... Südhof, T. C. (1997). Binding of Neuroligins to PSD-95. *Science*, 277(5331), 1511-1515. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1511>
- Jamain, Stéphane, Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., ... Paris Autism Research International Sibpair Study. (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, Stéphane, Radyushkin, K., Hammerschmidt, K., Granon, S., Boretius, S., Varoquaux, F., ... Brose, N. (2008). Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), 1710-1715. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711555105>
- Jaramillo, T. C., Liu, S., Pettersen, A., Birnbaum, S. G., & Powell, C. M. (2014). Autism-related neuroligin-3 mutation alters social behavior and spatial learning. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 7(2), 264-272. <https://doi.org/10.1002/aur.1362>
- Jaramillo, T. C., Speed, H. E., Xuan, Z., Reimers, J. M., Escamilla, C. O., Weaver, T. P., ... Powell, C. M. (2017). Novel Shank3 mutant exhibits behaviors with face validity for autism and altered striatal and hippocampal function. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 10(1), 42-65. <https://doi.org/10.1002/aur.1664>
- Jaramillo, T. C., Speed, H. E., Xuan, Z., Reimers, J. M., Liu, S., & Powell, C. M. (2016). Altered Striatal Synaptic Function and Abnormal Behaviour in Shank3 Exon4-9 Deletion Mouse Model of Autism. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 9(3), 350-375. <https://doi.org/10.1002/aur.1529>

- Jiang, Y.-H., & 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>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of neural science* (5.^a ed.). Mc Graw Hill.
- Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact, 2(2), 217-250.
- Kazdoba, T. M., Leach, P. T., & Crawley, J. N. (2016). Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism. *Genes, Brain, and Behavior*, 15(1), 7-26. <https://doi.org/10.1111/gbb.12256>
- Kindler, S., & Kreienkamp, H.-J. (2012). Dendritic mRNA targeting and translation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 970, 285-305. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_13
- 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., ... Jin, X. (2010). Splice Form Dependence of β -Neurexin/Neurologin Binding Interactions. *Neuron*, 67(1), 61-74. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.001>
- Korb, E., & Finkbeiner, S. (2011). Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends in neurosciences*, 34(11), 591-598. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.08.007>
- Kravitz, A. V., & Kreitzer, A. C. (2012). Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 27(3), 167-177. <https://doi.org/10.1152/physiol.00004.2012>
- Laarakker, M. C., Reinders, N. R., Bruining, H., Ophoff, R. A., & Kas, M. J. H. (2012). Sex-dependent novelty response in neurexin-1 α mutant mice. *PloS One*, 7(2), e31503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031503>
- Langen, M., Bos, D., Noordermeer, S. D. S., Nederveen, H., van Engeland, H., & Durston, S. (2014). Changes in the development of striatum are involved in repetitive behavior in autism. *Biological Psychiatry*, 76(5), 405-411. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.08.013>
- Lau, C. G., & Murthy, V. N. (2012). Activity-dependent regulation of inhibition via GAD67. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(25), 8521-8531. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1245-12.2012>
- Laumonnier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., Moizard, M.-P., ... Briault, S. (2004). X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the

- NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *American Journal of Human Genetics*, 74(3), 552-557. <https://doi.org/10.1086/382137>
- Lee, E., Rhim, I., Lee, J. W., Ghim, J.-W., Lee, S., Kim, E., & Jung, M. W. (2016). Enhanced Neuronal Activity in the Medial Prefrontal Cortex during Social Approach Behavior. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(26), 6926-6936. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0307-16.2016>
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12), 2531-2537. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
- Lin, Y.-C., Frei, J. A., Kilander, M. B. C., Shen, W., & Blatt, G. J. (2016). A Subset of Autism-Associated Genes Regulate the Structural Stability of Neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 263. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00263>
- Lipton, J. O., & Sahin, M. (2014). The neurology of mTOR. *Neuron*, 84(2), 275-291. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.034>
- Macpherson, T., Morita, M., & Hikida, T. (2014). Striatal direct and indirect pathways control decision-making behavior. *Frontiers in Psychology*, 5, 1301. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.01301>
- Marco, S., Giralt, A., Petrovic, M. M., Pouladi, M. A., Martínez-Turrillas, R., Martínez-Hernández, J., ... Pérez-Otaño, I. (2013). Suppressing aberrant GluN3A expression rescues synaptic and behavioral impairments in Huntington's disease models. *Nature Medicine*, 19(8), 1030-1038. <https://doi.org/10.1038/nm.3246>
- Martínez-Cerdeño, V. (2017). Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. *Developmental Neurobiology*, 77(4), 393-404. <https://doi.org/10.1002/dneu.22417>
- Mataga, N., Mizuguchi, Y., & Hensch, T. K. (2004). Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron*, 44(6), 1031-1041. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.028>
- Maxwell, C. R., Villalobos, M. E., Schultz, R. T., Herpertz-Dahlmann, B., Konrad, K., & Kohls, G. (2015). Atypical laterality of resting gamma oscillations in autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 45(2), 292-297. <https://doi.org/10.1007/s10803-013-1842-7>
- Mayford, M., Bach, M. E., Huang, Y. Y., Wang, L., Hawkins, R. D., & Kandel, E. R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5293), 1678-1683.

- McGraw, C. M., Samaco, R. C., & Zoghbi, H. Y. (2011). Adult neural function requires MeCP2. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6039), 186. <https://doi.org/10.1126/science.1206593>
- Mei, Y., Monteiro, P., Zhou, Y., Kim, J.-A., Gao, X., Fu, Z., & Feng, G. (2016). Adult Restoration of Shank3 Expression Rescues Selective Autistic-Like Phenotypes. *Nature*, 530(7591), 481-484. <https://doi.org/10.1038/nature16971>
- Minatohara, K., Akiyoshi, M., & Okuno, H. (2016). Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00078>
- Missler, M., Hammer, R. E., & Südhof, T. C. (1998). Neurexophilin binding to alpha-neurexins. A single LNS domain functions as an independently folding ligand-binding unit. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(52), 34716-34723.
- Missler, Markus, Zhang, W., Rohlmann, A., Kattenstroth, G., Hammer, R. E., Gottmann, K., & Südhof, T. C. (2003). α -Neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 423(6943), 939-948. <https://doi.org/10.1038/nature01755>
- Mitra, P., & Bokil, H. (2008). *Observed Brain Dynamics*. New York: Oxford University Press.
- Monteiro, P., & Feng, G. (2017). SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(3), 147-157. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.183>
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., ... Crawley, J. N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain, and Behavior*, 3(5), 287-302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>
- Nácher, V., Ledberg, A., Deco, G., & Romo, R. (2013). Coherent delta-band oscillations between cortical areas correlate with decision making. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(37), 15085-15090. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314681110>
- Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., ... Sheng, M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*, 23(3), 569-582.
- Nelson, S. B., & Valakh, V. (2015). Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron*, 87(4), 684-698. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.033>

- Nguyen, T., & Südhof, T. C. (1997). Binding properties of neuroligin 1 and neuroligin 2 reveal function as heterophilic cell adhesion molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 26032-26039.
- Nguyen, T.-M., Schreiner, D., Xiao, L., Traunmüller, L., Bornmann, C., & Scheiffele, P. (2016). An alternative splicing switch shapes neuroligin repertoires in principal neurons versus interneurons in the mouse hippocampus. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.22757>
- Nishimura-Akiyoshi, S., Niimi, K., Nakashiba, T., & Itohara, S. (2007). Axonal netrin-Gs transneuronally determine lamina-specific subdendritic segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), 14801-14806. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706919104>
- Odeh, F., Leergaard, T. B., Boy, J., Schmidt, T., Riess, O., & Bjaalie, J. G. (2011). Atlas of transgenic Tet-Off Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and prion protein promoter activity in the mouse brain. *NeuroImage*, 54(4), 2603-2611. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.11.032>
- O'Reilly, C., Lewis, J. D., & Elsabbagh, M. (2017). Is functional brain connectivity atypical in autism? A systematic review of EEG and MEG studies. *PloS One*, 12(5), e0175870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175870>
- Orekhova, E. V., Stroganova, T. A., Nygren, G., Tsetlin, M. M., Posikera, I. N., Gillberg, C., & Elam, M. (2007). Excess of High Frequency Electroencephalogram Oscillations in Boys with Autism. *Biological Psychiatry*, 62(9), 1022-1029. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.12.029>
- Parikshak, N. N., Luo, R., Zhang, A., Won, H., Lowe, J. K., Chandran, V., ... Geschwind, D. H. (2013). Integrative functional genomic analyses implicate specific molecular pathways and circuits in autism. *Cell*, 155(5), 1008-1021. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.031>
- Parker, K. L., Chen, K.-H., Kingyon, J. R., Cavanagh, J. F., & Narayanan, N. S. (2015). Medial frontal ~4-Hz activity in humans and rodents is attenuated in PD patients and in rodents with cortical dopamine depletion. *Journal of Neurophysiology*, 114(2), 1310-1320. <https://doi.org/10.1152/jn.00412.2015>
- Pasciuto, E., Borrie, S. C., Kanellopoulos, A. K., Santos, A. R., Cappuyns, E., D'Andrea, 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., ... Feng, G. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, 472(7344), 437-442. <https://doi.org/10.1038/nature09965>
- Peñagarikano, O., Abrahams, B. S., Herman, E. I., Winden, K. D., Gdalyahu, A., Dong, H., ... Geschwind, D. H. (2011). Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell*, 147(1), 235-246. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.040>
- Pettem, K. L., Yokomaku, D., Luo, L., Linhoff, M. W., Prasad, T., Connor, S. A., ... Craig, A. M. (2013). The specific α -neurexin interactor calsynenin-3 promotes excitatory and inhibitory synapse development. *Neuron*, 80(1), 113-128. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.016>
- Phelan, M. C. (2008). Deletion 22q13.3 syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3, 14. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-3-14>
- Phelan, M. C., Rogers, R. C., Saul, R. A., Stapleton, G. A., Sweet, K., McDermid, H., ... Kelly, D. P. (2001). 22q13 deletion syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 101(2), 91-99.
- Pin, J.-P., & Bettler, B. (2016). Organization and functions of mGlu and GABAB receptor complexes. *Nature*, 540(7631), 60-68. <https://doi.org/10.1038/nature20566>
- Pinto, D., Delaby, E., Merico, D., Barbosa, M., Merikangas, A., Klei, L., ... Scherer, S. W. (2014). Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *American Journal of Human Genetics*, 94(5), 677-694. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.018>
- Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., ... Varoqueaux, 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>
- Puts, N. A. J., Wodka, E. L., Harris, A. D., Crocetti, D., Tommerdahl, M., Mostofsky, S. H., & Edden, R. A. E. (2017). Reduced GABA and altered somatosensory function in children with autism spectrum disorder. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 10(4), 608-619. <https://doi.org/10.1002/aur.1691>
- Puts, N. A. J., Wodka, E. L., Tommerdahl, M., Mostofsky, S. H., & Edden, R. A. E. (2014). Impaired tactile processing in children with autism spectrum disorder. *Journal of Neurophysiology*, 111(9), 1803-1811. <https://doi.org/10.1152/jn.00890.2013>

- Rabaneda, 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>
- Rogers, D. C., Fisher, E. M., Brown, S. D., Peters, J., Hunter, A. J., & Martin, J. E. (1997). Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 8(10), 711-713.
- Rothwell, P. E., Fuccillo, M. V., Maxeiner, S., Hayton, S. J., Gokce, O., Lim, B. K., ... Südhof, T. C. (2014). Autism-associated neuroligin-3 mutations commonly impair striatal circuits to boost repetitive behaviors. *Cell*, 158(1), 198-212. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.045>
- Rubenstein, J. L. R., & Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain, and Behavior*, 2(5), 255-267.
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., & Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Developmental Neurobiology*, 71(1), 45-61. <https://doi.org/10.1002/dneu.20853>
- Sanders, S. J., He, X., Willsey, A. J., Ercan-Sencicek, A. G., Samocha, K. E., Cicek, A. E., ... State, M. W. (2015). Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron*, 87(6), 1215-1233. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.016>
- Schaaf, C. P., Boone, P. M., Sampath, S., Williams, C., Bader, P. I., Mueller, J. M., ... Cheung, S. W. (2012). Phenotypic spectrum and genotype-phenotype correlations of NRXN1 exon deletions. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 20(12), 1240-1247. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.95>
- Scheiffele, P. (2003). Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annual Review of Neuroscience*, 26, 485-508. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.043002.094940>
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., & Serafini, T. (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*, 101(6), 657-669.
- Schmeisser, M. J., Ey, E., Wegener, S., Bockmann, J., Stempel, A. V., Kuebler, A., ... Boeckers, T. M. (2012). Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature*, 486(7402), 256-260. <https://doi.org/10.1038/nature11015>
- Schreiner, D., Nguyen, T.-M., Russo, G., Heber, S., Patrignani, A., Ahrné, E., & Scheiffele, P. (2014). Targeted combinatorial alternative splicing generates brain region-specific

- repertoires of neurexins. *Neuron*, 84(2), 386-398.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.011>
- Schreiner, D., Simicevic, J., Ahrné, E., Schmidt, A., & Scheiffele, P. (2015). Quantitative isoform-profiling of highly diversified recognition molecules. *eLife*, 4, e07794.
<https://doi.org/10.7554/eLife.07794>
- Schuldiner, O., & Yaron, A. (2015). Mechanisms of developmental neurite pruning. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 72(1), 101-119. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1729-6>
- Shepherd, G. M. G. (2004). *The Synaptic Organization of the Brain* (5th ed.). Oxford University Press.
- Shepherd, G. M. G. (2013). Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(4), 278-291. <https://doi.org/10.1038/nrn3469>
- Shepherd, J. D., Rumbaugh, G., Wu, J., Chowdhury, S., Plath, N., Kuhl, D., ... Worley, P. F. (2006). Arc/Arg3.1 Mediates Homeostatic Synaptic Scaling of AMPA Receptors. *Neuron*, 52(3), 475-484. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.034>
- Shipp, S. (2017). The functional logic of corticostriatal connections. *Brain Structure & Function*, 222(2), 669-706. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1250-9>
- 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., ... 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>
- Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247), 698-702. <https://doi.org/10.1038/nature07991>
- Song, J.-Y., Ichtchenko, K., Südhof, T. C., & Brose, N. (1999). Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(3), 1100-1105. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.1100>
- Spacek, J. (1989). Dynamics of the Golgi method: a time-lapse study of the early stages of impregnation in single sections. *Journal of Neurocytology*, 18(1), 27-38.
- Speed, H. E., Masiulis, I., Gibson, J. R., & Powell, C. M. (2015). Increased Cortical Inhibition in Autism-Linked Neuroligin-3R451C Mice Is Due in Part to Loss of Endocannabinoid Signaling. *PLOS ONE*, 10(10), e0140638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140638>

- Stean, J. P. (1974). Some evidence of the nature of the Golgi-Cox deposit and its biochemical origin. *Histochemistry*, *40*(4), 377-383.
- Steffenburg, S., Gillberg, C., Hellgren, L., Andersson, L., Gillberg, I. C., Jakobsson, G., & Bohman, M. (1989). A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, *30*(3), 405-416.
- Sterky, F. H., Trotter, J. H., Lee, S.-J., Recktenwald, C. V., Du, X., Zhou, 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>
- Südhof, T. C., & Stevens, C. F. (2001). *Synapses*. JHU Press.
- Südhof, Thomas C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron*, *75*(1), 11-25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>
- Südhof, Thomas C., & Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005637>
- Sugita, S., Saito, F., Tang, J., Satz, J., Campbell, K., & Südhof, T. C. (2001). A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *The Journal of Cell Biology*, *154*(2), 435-445.
- Szatmari, P., Paterson, A. D., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Brian, J., Liu, X.-Q., ... Meyer, K. J. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature Genetics*, *39*(3), 319-328. <https://doi.org/10.1038/ng1985>
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., ... von Mering, C. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D362-D368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>
- Sztainberg, Y., & Zoghbi, H. Y. (2016). Lessons learned from studying syndromic autism spectrum disorders. *Nature Neuroscience*, *19*(11), 1408-1417. <https://doi.org/10.1038/nn.4420>
- Tabuchi, K., Blundell, J., Etherton, M. R., Hammer, R. E., Liu, X., Powell, C. M., & Südhof, T. C. (2007). A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5847), 71-76. <https://doi.org/10.1126/science.1146221>
- Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S.-H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., ... Sulzer, D. (2014). Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron*, *83*(5), 1131-1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>

- Taniguchi, H., Gollan, L., Scholl, F. G., Mahadomrongkul, V., Dobler, E., Limthong, N., ... Scheiffele, P. (2007). Silencing of neuroligin function by postsynaptic neurexins. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(11), 2815-2824. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0032-07.2007>
- Traunmüller, L., Gomez, A. M., Nguyen, T.-M., & Scheiffele, P. (2016). Control of neuronal synapse specification by a highly dedicated alternative splicing program. *Science (New York, N.Y.)*, *352*(6288), 982-986. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2397>
- Tu, J. C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J. P., Petralia, R. S., Brakeman, P., ... Worley, P. F. (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron*, *23*(3), 583-592.
- Uemura, T., Lee, S.-J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., ... Mishina, M. (2010). Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell*, *141*(6), 1068-1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.035>
- Ushkaryov, Y. A., Hata, Y., Ichtchenko, K., Moomaw, C., Afendis, S., Slaughter, C. A., & Südhof, T. C. (1994). Conserved domain structure of beta-neurexins. Unusual cleaved signal sequences in receptor-like neuronal cell-surface proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(16), 11987-11992.
- Ushkaryov, Y. A., Petrenko, A. G., Geppert, M., & Südhof, T. C. (1992). Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science (New York, N.Y.)*, *257*(5066), 50-56.
- Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., ... Brose, N. (2006). Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron*, *51*(6), 741-754. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.003>
- Varoqueaux, 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>
- Verde, E. M. R., Lee-Osbourne, J., Worley, P. F., Malinow, R., & Cline, H. T. (2006). Increased Expression of the Immediate-Early Gene Arc/Arg3.1 Reduces AMPA Receptor-Mediated Synaptic Transmission. *Neuron*, *52*(3), 461-474. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.031>
- Vogel-Ciernia, A., & Wood, M. A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, *69*, 8.31.1-17. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69>

- Wall, N. R., De La Parra, M., Callaway, E. M., & Kreitzer, A. C. (2013). Differential innervation of direct- and indirect-pathway striatal projection neurons. *Neuron*, *79*(2), 347-360. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.014>
- Wang, X., Bey, A. L., Katz, B. M., Badea, A., Kim, N., David, L. K., ... Jiang, Y.-H. (2016). Altered mGluR5-Homer scaffolds and corticostriatal connectivity in a Shank3 complete knockout model of autism. *Nature Communications*, *7*, 11459. <https://doi.org/10.1038/ncomms11459>
- Wang, X., McCoy, P. A., Rodriguiz, R. M., Pan, Y., Je, H. S., Roberts, A. C., ... Jiang, Y.-H. (2011). Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Human Molecular Genetics*, *20*(15), 3093-3108. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr212>
- Wass, S. (2011). Distortions and disconnections: disrupted brain connectivity in autism. *Brain and Cognition*, *75*(1), 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2010.10.005>
- Welch, J. M., Lu, J., Rodriguiz, R. M., Trotta, N. C., Peca, J., Ding, J.-D., ... Feng, G. (2007). Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature*, *448*(7156), 894-900. <https://doi.org/10.1038/nature06104>
- West, A. E., & Greenberg, M. E. (2011). Neuronal Activity-Regulated Gene Transcription in Synapse Development and Cognitive Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005744>
- Willsey, A. J., Sanders, S. J., Li, M., Dong, S., Tebbenkamp, A. T., Muhle, R. A., ... State, M. W. (2013). Coexpression networks implicate human midfetal deep cortical projection neurons in the pathogenesis of autism. *Cell*, *155*(5), 997-1007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.020>
- Wilson, H. L., Wong, A. C. C., Shaw, S. R., Tse, W.-Y., Stapleton, G. A., Phelan, M. C., ... McDermid, H. E. (2003). Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *Journal of Medical Genetics*, *40*(8), 575-584.
- Wilson, T. W., Rojas, D. C., Reite, M. L., Teale, P. D., & Rogers, S. J. (2007). Children and adolescents with autism exhibit reduced MEG steady-state gamma responses. *Biological Psychiatry*, *62*(3), 192-197. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.07.002>
- Wiśniowiecka-Kowalnik, B., Nesteruk, M., Peters, S. U., Xia, Z., Cooper, M. L., Savage, S., ... 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: The Official Publication of the*

- International Society of Psychiatric Genetics*, 153B(5), 983-993.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31064>
- Wöhr, M., Roulet, F. I., Hung, A. Y., Sheng, M., & Crawley, J. N. (2011). Communication impairments in mice lacking Shank1: reduced levels of ultrasonic vocalizations and scent marking behavior. *PloS One*, 6(6), e20631.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020631>
- Won, H., Lee, H.-R., Gee, H. Y., Mah, W., Kim, J.-I., Lee, J., ... Kim, E. (2012). Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. *Nature*, 486(7402), 261-265. <https://doi.org/10.1038/nature11208>
- Woo, J., Kwon, S.-K., Nam, J., Choi, S., Takahashi, H., Krueger, D., ... Kim, E. (2013). The adhesion protein IgSF9b is coupled to neuroligin 2 via S-SCAM to promote inhibitory synapse development. *The Journal of Cell Biology*, 201(6), 929-944.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201209132>
- Yang, M., & Crawley, J. N. (2009). Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]*, CHAPTER, Unit-8.24. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0824s48>
- Yizhar, O., Fenno, L. E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T. J., O'Shea, D. J., ... Deisseroth, K. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*, 477(7363), 171-178. <https://doi.org/10.1038/nature10360>
- Yuen, R. K. C., Merico, D., Bookman, M., Howe, J. L., Thiruvahindrapuram, B., Patel, R. V., ... Scherer, S. W. (2017). Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience, advance online publication*.
<https://doi.org/10.1038/nn.4524>
- Zaqout, S., & Kaindl, A. M. (2016). Golgi-Cox Staining Step by Step. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10, 38. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00038>

IX. Anexos

1. Análisis proteómico de sinaptosomas mediante iTRAQ

Anexo 1.1. Proteínas con mayores cambios de expresión en sinaptosomas de ratones β Nrx1 Δ C

Incremento				
Accession	Description	SCORE	Coverage	Ratio
Q3UX10	Tubulin alpha chain-like 3 OS=Mus musculus GN=Tubal3 PE=2 SV=2 - [TBAL3_MOUSE]	4,45	76,01%	2,19
A2AH85	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component OS=Mus musculus GN=Eftud2 PE=4 SV=1 - [A2AH85_MOUSE]	1,64	76,23%	1,72
Q60771	Claudin-11 OS=Mus musculus GN=Cldn11 PE=1 SV=1 - [CLD11_MOUSE]	15,83	28,02%	1,57
Q3URD3	Sarcolemmal membrane-associated protein OS=Mus musculus GN=Slmap PE=1 SV=2 - [SLMAP_MOUSE]	1,76	87,10%	1,51
P60202	Myelin proteolipid protein OS=Mus musculus GN=Plp1 PE=1 SV=2 - [MYPR_MOUSE]	21,64	47,65%	1,47
P70182	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 alpha OS=Mus musculus GN=Pip5k1a PE=1 SV=2 - [PI51A_MOUSE]	18,43	70,15%	1,46
Q8BHC1	Ras-related protein Rab-39B OS=Mus musculus GN=Rab39b PE=2 SV=1 - [RB39B_MOUSE]	51,04	79,34%	1,41
Q3TTY5	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Mus musculus GN=Krt2 PE=1 SV=1 - [K22E_MOUSE]	3,84	90,95%	1,35
Q91Y97	Fructose-bisphosphate aldolase B OS=Mus musculus GN=Aldob PE=1 SV=3 - [ALDOB_MOUSE]	3,19	72,25%	1,34
Q9R0N5	Synaptotagmin-5 OS=Mus musculus GN=Syts5 PE=1 SV=1 - [SYT5_MOUSE]	39,80	68,91%	1,33
P08752	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 OS=Mus musculus GN=Gnai2 PE=1 SV=5 - [GNAI2_MOUSE]	68,56	90,70%	1,32
Q61735	Leukocyte surface antigen CD47 OS=Mus musculus GN=Cd47 PE=1 SV=2 - [CD47_MOUSE]	1,96	49,50%	1,30
P16330	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase OS=Mus musculus GN=Cnp PE=1 SV=3 - [CN37_MOUSE]	88,81	80,24%	1,29
Q3UKW2	Calmodulin OS=Mus musculus GN=Calm1 PE=2 SV=1 - [Q3UKW2_MOUSE]	14,51	100,00%	1,28
E9PWP6	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Rims1 PE=4 SV=3 - [E9PWP6_MOUSE]	46,96	85,06%	1,28
Q91YM2	Rho GTPase-activating protein 35 OS=Mus musculus GN=Arhgap35 PE=1 SV=3 - [RHG35_MOUSE]	2,24	78,79%	1,27
D3YTU0	Vesicle-associated membrane protein 1 OS=Mus musculus GN=Vamp1 PE=4 SV=1 - [D3YTU0_MOUSE]	1,80	94,74%	1,26
O35658	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=C1qbp PE=1 SV=1 - [C1QBP_MOUSE]	62,16	84,89%	1,26
A6ZI46	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Mus musculus GN=Aldoart1 PE=2 SV=1 - [A6ZI46_MOUSE]	86,80	84,01%	1,25
Q80UW2	F-box only protein 2 OS=Mus musculus GN=Fbxo2 PE=1 SV=1 -	4,08	62,96%	1,25

[FBX2_MOUSE]				
Q3TPJ8	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 OS=Mus musculus GN=Dync1i2 PE=2 SV=1 - [Q3TPJ8_MOUSE]	4,08	71,84%	1,25
Q61425	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hadh PE=1 SV=2 - [HCDH_MOUSE]	2,12	63,06%	1,25
P03995	Glial fibrillary acidic protein OS=Mus musculus GN=Gfap PE=1 SV=4 - [GFAP_MOUSE]	1,66	96,98%	1,25
P17809	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 OS=Mus musculus GN=Slc2a1 PE=1 SV=4 - [GTR1_MOUSE]	3,83	51,42%	1,25
E9Q6G4	ATP-binding cassette sub-family A member 7 OS=Mus musculus GN=Abca7 PE=1 SV=1 - [E9Q6G4_MOUSE]	1,25	65,81%	1,25
Q9QZS3	Protein numb homolog OS=Mus musculus GN=Numb PE=1 SV=1 - [NUMB_MOUSE]	1,75	59,26%	1,24
Q91XF0	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase OS=Mus musculus GN=Pnpo PE=1 SV=1 - [PNPO_MOUSE]	2,79	79,31%	1,24
Q61024	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] OS=Mus musculus GN=Asns PE=2 SV=3 - [ASNS_MOUSE]	1,80	82,35%	1,24
P46425	Glutathione S-transferase P 2 OS=Mus musculus GN=Gstp2 PE=2 SV=2 - [GSTP2_MOUSE]	43,36	79,52%	1,23
E9Q1P5	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Shank3 PE=4 SV=4 - [E9Q1P5_MOUSE]	14,52	91,85%	1,23
A8DUK4	Beta-globin OS=Mus musculus GN=Hbbt1 PE=3 SV=1 - [A8DUK4_MOUSE]	11,12	89,12%	1,23
P54071	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial OS=Mus musculus GN=Idh2 PE=1 SV=3 - [IDHP_MOUSE]	32,48	88,05%	1,23
P50114	Protein S100-B OS=Mus musculus GN=S100b PE=2 SV=2 - [S100B_MOUSE]	5,64	97,83%	1,23
Q9JJV2	Profilin-2 OS=Mus musculus GN=Pfn2 PE=1 SV=3 - [PROF2_MOUSE]	16,75	80,00%	1,22
Q63810	Calcineurin subunit B type 1 OS=Mus musculus GN=Ppp3r1 PE=1 SV=3 - [CANB1_MOUSE]	29,29	77,06%	1,22
Q3UY21	Myelin oligodendrocyte glycoprotein, isoform CRA_b OS=Mus musculus GN=Mog PE=2 SV=1 - [Q3UY21_MOUSE]	4,56	73,28%	1,22
Q9JH15	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=lvd PE=1 SV=1 - [IVD_MOUSE]	3,39	87,50%	1,22
Q9CPX6	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3 OS=Mus musculus GN=Atg3 PE=1 SV=1 - [ATG3_MOUSE]	12,60	76,11%	1,21
P50544	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Acadvl PE=1 SV=3 - [ACADV_MOUSE]	4,95	94,21%	1,21
Q9CXP8	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-10 OS=Mus musculus GN=Gng10 PE=3 SV=1 - [GBG10_MOUSE]	7,62	70,59%	1,21
Q9DBB8	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase OS=Mus musculus GN=Dhdh PE=2 SV=1 - [DHDH_MOUSE]	5,54	67,27%	1,21
Q9CQJ8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9 OS=Mus musculus GN=Ndufb9 PE=1 SV=3 - [NDUB9_MOUSE]	2,41	90,50%	1,21
B8QI34	Liprin-alpha 2 OS=Mus musculus GN=Ppfia2 PE=2 SV=1 - [B8QI34_MOUSE]	9,59	86,48%	1,21
O08914	Fatty-acid amide hydrolase 1 OS=Mus musculus GN=Faah PE=2 SV=1 - [FAAH1_MOUSE]	3,80	60,97%	1,21
Q8R366	Immunoglobulin superfamily member 8 OS=Mus musculus GN=Igsf8 PE=1 SV=2 - [IGSF8_MOUSE]	67,67	70,21%	1,21
A2AQ87	SH2 domain-containing adapter protein F (Fragment) OS=Mus musculus GN=Shf PE=1 SV=1 - [A2AQ87_MOUSE]	2,15	70,85%	1,21

P52825	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cpt2 PE=1 SV=2 - [CPT2_MOUSE]	5,82	78,42%	1,21
Q9D2G2	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dlst PE=1 SV=1 - [ODO2_MOUSE]	41,86	66,52%	1,21
Q9R1P3	Proteasome subunit beta type-2 OS=Mus musculus GN=Psmb2 PE=1 SV=1 - [PSB2_MOUSE]	5,10	93,53%	1,20
Q9R1P0	Proteasome subunit alpha type-4 OS=Mus musculus GN=Psm4 PE=1 SV=1 - [PSA4_MOUSE]	1,82	84,67%	1,20
Descenso				
Accession	Description	SCORE	Coverage	Ratio
Q6PHC1	Alpha-enolase OS=Mus musculus GN=Eno1 PE=2 SV=1 - [Q6PHC1_MOUSE]	182,98	80,33%	0,34
Q9JKS5	Intracellular hyaluronan-binding protein 4 OS=Mus musculus GN=Habp4 PE=1 SV=2 - [HABP4_MOUSE]	2,78	80,78%	0,52
D3Z3N9	Neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adapter 2 OS=Mus musculus GN=Nyap2 PE=1 SV=1 - [D3Z3N9_MOUSE]	2,01	80,94%	0,60
Q61625	Glutamate receptor ionotropic, delta-2 OS=Mus musculus GN=Grid2 PE=1 SV=1 - [GRID2_MOUSE]	2,12	65,24%	0,61
Q9D0A3	Arpin OS=Mus musculus GN=Arpin PE=1 SV=1 - [ARPIN_MOUSE]	2,02	58,41%	0,63
P61961	Ubiquitin-fold modifier 1 OS=Mus musculus GN=Ufm1 PE=1 SV=1 - [UFM1_MOUSE]	2,29	92,94%	0,64
P60764	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 OS=Mus musculus GN=Rac3 PE=1 SV=1 - [RAC3_MOUSE]	2,18	57,29%	0,66
Z4YJR7	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Sorbs2 PE=1 SV=1 - [Z4YJR7_MOUSE]	51,51	83,97%	0,66
F6ZIA4	Myelin basic protein (Fragment) OS=Mus musculus GN=Mbp PE=1 SV=1 - [F6ZIA4_MOUSE]	101,95	100,00%	0,67
A2ASZ8	Calcium-binding mitochondrial carrier protein ScaMC-2 OS=Mus musculus GN=Slc25a25 PE=2 SV=1 - [SCMC2_MOUSE]	6,49	78,25%	0,67
Q9ESP1	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1 OS=Mus musculus GN=Sdf2l1 PE=2 SV=2 - [SDF2L_MOUSE]	2,83	75,11%	0,67
Q920Q6	RNA-binding protein Musashi homolog 2 OS=Mus musculus GN=Msi2 PE=1 SV=1 - [MSI2H_MOUSE]	2,19	66,18%	0,67
Q9D6Y7	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase OS=Mus musculus GN=Msra PE=1 SV=1 - [MSRA_MOUSE]	9,51	93,13%	0,67
Q8C817	Transmembrane protein 200A OS=Mus musculus GN=Tmem200a PE=1 SV=1 - [T200A_MOUSE]	2,03	89,82%	0,70
Q9CR26	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog OS=Mus musculus GN=Vta1 PE=1 SV=1 - [VTA1_MOUSE]	8,62	53,72%	0,71
Q7TQH0	Ataxin-2-like protein OS=Mus musculus GN=Atxn2l PE=1 SV=1 - [ATX2L_MOUSE]	3,16	56,24%	0,72
Q3V1Q3	Adenylate cyclase type 2 OS=Mus musculus GN=Adcy2 PE=2 SV=1 - [Q3V1Q3_MOUSE]	2,92	66,30%	0,73
Q6GSS7	Histone H2A type 2-A OS=Mus musculus GN=Hist2h2aa1 PE=1 SV=3 - [H2A2A_MOUSE]	6,65	92,31%	0,73
Q9DCP2	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 3 OS=Mus musculus GN=Slc38a3 PE=2 SV=1 - [S38A3_MOUSE]	25,83	44,75%	0,73
O35350	Calpain-1 catalytic subunit OS=Mus musculus GN=Capn1 PE=1 SV=1 - [CAN1_MOUSE]	4,45	69,42%	0,74
Q8VDM4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Mus	17,06	83,70%	0,74

	musculus GN=Psm2 PE=1 SV=1 - [PSMD2_MOUSE]			
Q9JIG4	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3F OS=Mus musculus GN=Ppp1r3f PE=1 SV=3 - [PPR3F_MOUSE]	5,48	68,84%	0,74
Q8BQU6	Gap junction gamma-2 protein OS=Mus musculus GN=Gjc2 PE=1 SV=2 - [CXG2_MOUSE]	2,52	73,41%	0,74
G3UX44	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8 (Fragment) OS=Mus musculus GN=H2-Ke6 PE=1 SV=1 - [G3UX44_MOUSE]	9,90	94,87%	0,75
O88696	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Clpp PE=1 SV=1 - [CLPP_MOUSE]	2,12	74,26%	0,76
F6U775	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial (Fragment) OS=Mus musculus GN=Opa1 PE=4 SV=1 - [F6U775_MOUSE]	37,21	96,28%	0,76
P35980	60S ribosomal protein L18 OS=Mus musculus GN=Rpl18 PE=2 SV=3 - [RL18_MOUSE]	16,06	80,32%	0,76
E9PV26	Protein Prr36 OS=Mus musculus GN=Prr36 PE=1 SV=1 - [E9PV26_MOUSE]	16,00	42,17%	0,76
Q60575	Kinesin-like protein KIF1B OS=Mus musculus GN=Kif1b PE=1 SV=2 - [KIF1B_MOUSE]	3,68	77,53%	0,77
Q9CZ44	NSFL1 cofactor p47 OS=Mus musculus GN=Nsf1c PE=1 SV=1 - [NSF1C_MOUSE]	1,68	84,05%	0,77
F7C376	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C OS=Mus musculus GN=Cacna1c PE=3 SV=2 - [F7C376_MOUSE]	2,54	65,35%	0,78
A2A4A6	Phosphoinositide phospholipase C OS=Mus musculus GN=Plcg1 PE=4 SV=1 - [A2A4A6_MOUSE]	5,05	69,15%	0,78
E9Q4K0	Actin-binding LIM protein 2 OS=Mus musculus GN=Ablim2 PE=1 SV=1 - [E9Q4K0_MOUSE]	35,64	90,66%	0,78
E9QKH8	Catenin delta-2 OS=Mus musculus GN=Ctnnd2 PE=1 SV=1 - [E9QKH8_MOUSE]	111,73	75,84%	0,78
Q9QXT0	Protein canopy homolog 2 OS=Mus musculus GN=Cnpy2 PE=1 SV=1 - [CNPY2_MOUSE]	3,34	90,66%	0,79
Q99M71	Mammalian ependymin-related protein 1 OS=Mus musculus GN=Epdr1 PE=2 SV=1 - [EPDR1_MOUSE]	3,41	59,82%	0,79
P31001	Desmin OS=Mus musculus GN=Des PE=1 SV=3 - [DESM_MOUSE]	1,67	95,31%	0,79
Q8C1Y8	Vacuolar fusion protein CCZ1 homolog OS=Mus musculus GN=Ccz1 PE=1 SV=1 - [CCZ1_MOUSE]	9,40	88,75%	0,79
Q8R5M8	Cell adhesion molecule 1 OS=Mus musculus GN=Cadm1 PE=1 SV=2 - [CADM1_MOUSE]	8,70	62,72%	0,79
Q9QVP9	Protein-tyrosine kinase 2-beta OS=Mus musculus GN=Ptk2b PE=1 SV=2 - [FAK2_MOUSE]	17,69	86,03%	0,79
Q91V92	ATP-citrate synthase OS=Mus musculus GN=Acly PE=1 SV=1 - [ACLY_MOUSE]	61,56	74,98%	0,79
Q8BNU0	Armadillo repeat-containing protein 6 OS=Mus musculus GN=Armc6 PE=2 SV=1 - [ARMC6_MOUSE]	2,51	64,96%	0,79
Q0VE82	Copine-7 OS=Mus musculus GN=Cpne7 PE=2 SV=1 - [CPNE7_MOUSE]	1,63	79,53%	0,79
G3UW70	MCG21719 OS=Mus musculus GN=Lamtor5 PE=4 SV=1 - [G3UW70_MOUSE]	17,23	93,10%	0,79
P97772	Metabotropic glutamate receptor 1 OS=Mus musculus GN=Grm1 PE=1 SV=2 - [GRM1_MOUSE]	2,17	65,72%	0,80

Tabla 14. Listado de proteínas con $0.8 > \text{ratio} > 1.2$ en sinaptosomas de ratones $\beta\text{Nrx1}\Delta\text{C}$. En las columnas se indica el código UniProtKB de la proteína (*accession*), el nombre completo de

la proteína, gen que la codifica y especie de referencia (*description*), el SCORE asignado según la calidad de detección en el experimento, el porcentaje de la secuencia cubierta por los péptidos detectados (*coverage*) y el ratio de expresión obtenido. Las proteínas están separadas entre las que presentan un ratio >1.2 (parte superior de la tabla, encabezado sombreado en verde) y un ratio <0.8 (parte inferior de la tabla, encabezado sombreado en rojo) y ordenadas de mayor a menor cambio según estos ratios.

Anexo 1.2. Enriquecimiento en rutas KEGG en el experimento de iTRAQ en sinaptosomas

KEGG PATHWAYS			
<i>#pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>observed gene count</i>	<i>fdr</i>
4724	Glutamatergic synapse	8	6.04e-06
4723	Retrograde endocannabinoid signaling	7	2.97e-05
1120	Microbial metabolism in diverse environments	7	0.000592
4020	Calcium signaling pathway	7	0.000601
4727	GABAergic synapse	5	0.00177
4713	Circadian entrainment	5	0.00193
1200	Carbon metabolism	5	0.00323
1100	Metabolic pathways	15	0.00382
4720	Long-term potentiation	4	0.00382
4670	Leukocyte transendothelial migration	5	0.00405
4015	Rap1 signaling pathway	6	0.00578
1230	Biosynthesis of amino acids	4	0.0058
20	Citrate cycle (TCA cycle)	3	0.00604
4540	Gap junction	4	0.00774
4912	GnRH signaling pathway	4	0.00774
4921	Oxytocin signaling pathway	5	0.00774
4022	cGMP-PKG signaling pathway	5	0.00916
4915	Estrogen signaling pathway	4	0.00916
5010	Alzheimer s disease	5	0.00916
3050	Proteasome	3	0.0104
71	Fatty acid degradation	3	0.0113
1212	Fatty acid metabolism	3	0.0141
4725	Cholinergic synapse	4	0.0141
4650	Natural killer cell mediated cytotoxicity	4	0.0144
4728	Dopaminergic synapse	4	0.0194
4360	Axon guidance	4	0.0196
4370	VEGF signaling pathway	3	0.0196
4730	Long-term depression	3	0.0196

10	Glycolysis / Gluconeogenesis	3	0.0201
5031	Amphetamine addiction	3	0.0201
4261	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	4	0.0242
5034	Alcoholism	4	0.0242
4971	Gastric acid secretion	3	0.0258
4070	Phosphatidylinositol signaling system	3	0.034
4911	Insulin secretion	3	0.0407
5414	Dilated cardiomyopathy	3	0.045
4062	Chemokine signaling pathway	4	0.0457
5032	Morphine addiction	3	0.0457
30	Pentose phosphate pathway	2	0.0489

Tabla 15. Rutas KEGG enriquecidas en las proteínas con $0.8 > \text{ratio} > 1.2$ en el experimento iTRAQ. Las columnas indican el identificador de la ruta (*#pathway ID*), la descripción de la ruta (*description*), el número de proteínas con $0.8 > \text{ratio} > 1.2$ asociadas a esa ruta (*observed gene count*) y la significancia estadística del enriquecimiento en cada ruta.

Anexo 1.3. Proteínas asociadas a algunas de las rutas más enriquecidas en el experimento de iTRAQ en sinaptosomas

<i>Description</i>	<i>Ratio</i>	<i>Glutamatergic synapse</i>	<i>Retrograde endocannabinoid signaling</i>	<i>Calcium signaling pathway</i>	<i>GABAergic synapse</i>
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 OS=Mus musculus GN=Gnai2 PE=1 SV=5 - [GNAI2_MOUSE]	1,32	Gnai2	Gnai2	-	Gnai2
Calmodulin OS=Mus musculus GN=Calm1 PE=2 SV=1 - [Q3UKW2_MOUSE]	1,28	-	-	Calm1	-
Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Rims1 PE=4 SV=3 - [E9PWP6_MOUSE]	1,28	-	Rims1	-	-
SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Shank3 PE=4 SV=4 - [E9Q1P5_MOUSE]	1,23	Shank3	-	-	-
Calcineurin subunit B type 1 OS=Mus musculus GN=Ppp3r1 PE=1 SV=3 - [CANB1_MOUSE]	1,22	Ppp3r1	-	Ppp3r1	-
Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(o) subunit gamma-10 OS=Mus musculus GN=Gng10 PE=3 SV=1 - [GBG10_MOUSE]	1,21	Gng10	Gng10	-	Gng10
Fatty-acid amide hydrolase 1 OS=Mus musculus GN=Faah PE=2 SV=1 - [FAAH1_MOUSE]	1,21	-	Faah	-	-
Adenylate cyclase type 2 OS=Mus musculus GN=Adcy2 PE=2 SV=1 - [Q3V1Q3_MOUSE]	0,73	Adcy2	Adcy2	Adcy2	Adcy2
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 3 OS=Mus musculus GN=Slc38a3 PE=2 SV=1 - [S38A3_MOUSE]	0,73	Slc38a3	-	-	Slc38a3
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C OS=Mus musculus GN=Cacna1c PE=3 SV=2 - [F7C376_MOUSE]	0,78	Cacna1c	Cacna1c	Cacna1c	Cacna1c
Phosphoinositide phospholipase C OS=Mus musculus GN=Plcg1 PE=4 SV=1 - [A2A4A6_MOUSE]	0,78	-	-	Plcg1	-
Protein-tyrosine kinase 2-beta OS=Mus musculus GN=Ptk2b PE=1 SV=2 - [FAK2_MOUSE]	0,79	-	-	Ptk2b	-
Metabotropic glutamate receptor 1 OS=Mus musculus GN=Grm1 PE=1 SV=2 - [GRM1_MOUSE]	0,80	Grm1	Grm1	Grm1	-

Tabla 16. Listado de proteínas asociadas a algunas de las rutas KEGG más enriquecidas en el experimento iTRAQ. Se indica en columnas independientes el nombre completo de la proteína, gen que la codifica y especie de referencia (*description*), el ratio obtenido en el experimento de iTRAQ y la presencia de las proteínas en las rutas KEGG indicadas. En las columnas de las rutas KEGG se ha introducido el nombre de los genes asociados con la ruta. En verde se somborean las proteínas incrementadas en las muestras β Nrx1 Δ C con ratio >1.2 y en rojo las que descienden con ratio <0.8; ambos rangos están ordenados de mayor a menor cambio en el ratio.

2. Ontología génica de los genes con expresión alterada en el *array*

Anexo 2. Ontología génica de los genes que superan el umbral 0.8 > FC > 1.20 en el *array*

BIOLOGICAL PROCESS			
#pathway ID	pathway description	observed gene count	fdr
GO.0034765	regulation of ion transmembrane transport	16	0.000428
GO.0043269	regulation of ion transport	20	0.000428
GO.0050433	regulation of catecholamine secretion	6	0.00217
GO.0032409	regulation of transporter activity	10	0.00621
GO.0007268	synaptic transmission	13	0.00995
GO.0032412	regulation of ion transmembrane transporter activity	9	0.0147
GO.1900449	regulation of glutamate receptor signaling pathway	5	0.0147
GO.0048148	behavioral response to cocaine	4	0.0162
GO.0043270	positive regulation of ion transport	10	0.0166
GO.0007267	cell-cell signaling	16	0.0182
GO.0007218	neuropeptide signaling pathway	7	0.0216
GO.0007186	G-protein coupled receptor signaling pathway	19	0.036
GO.0051924	regulation of calcium ion transport	9	0.036
GO.0017157	regulation of exocytosis	8	0.0419
MOLECULAR FUNCTION			
GO.0004930	G-protein coupled receptor activity	19	0.00113
GO.0004888	transmembrane signaling receptor activity	22	0.00661
GO.0038023	signaling receptor activity	22	0.0176
GO.0004872	receptor activity	23	0.0314
CELLULAR COMPONENT			
GO.0005887	integral component of plasma membrane	23	0.0041
GO.0031226	intrinsic component of plasma membrane	24	0.0041

GO.0034702	ion channel complex	11	0.00418
GO.0005886	plasma membrane	57	0.00459
GO.0071944	cell periphery	57	0.00521
GO.0044459	plasma membrane part	33	0.015
GO.0044446	intracellular organelle part	40	0.0196
GO.0042383	sarcolemma	4	0.0205
GO.0005759	mitochondrial matrix	6	0.0224
GO.0030016	myofibril	5	0.0224
GO.0044429	mitochondrial part	10	0.0229
GO.0044430	cytoskeletal part	13	0.025
GO.0098797	plasma membrane protein complex	7	0.031
GO.0031966	mitochondrial membrane	8	0.0312
GO.0005912	adherens junction	7	0.0404
GO.0098796	membrane protein complex	10	0.0482

Tabla 17. Enriquecimiento de categorías GO en el *array*. Genes. De los 480 transcritos cuyo cambio supera el umbral de $0.8 > FC > 1.20$ con $p\text{-value} < 0.05$, sólo 210 poseen una categoría GO asociada. Los términos GO se agrupan en procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares. Las columnas indican el identificador del término GO (*#pathway ID*), la descripción del término (*description*), el número de proteínas con $0.8 > \text{ratio} > 1.2$ asociadas a ese término (*observed gene count*) y la significancia estadística del enriquecimiento de genes agrupados en ese término.


3. Secuencias Sanger de la inserción del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C


Anexo 3.1. Secuencia de la inserción del extremo 5' del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C en el genoma de ratón


Oligonucleótidos utilizados:

- Sentido: 5' - GCCAGGATTTCAACCTATTGTAGTGA - 3'
- Antisentido: 5' - CATCTGGGAAGTGCCATGGT - 3'

Leyenda:

 intrón 1 de *Jam3*

 TRE-HA- β Nrx1 Δ C

 fragmento del promotor de *Jam3*

negrita: secuencia de hibridación de los oligonucleótidos

CCAGGATTTCAACCTATTGTAGTGACAACCTTTAGAATTTTTNGTGTCTTTAAAAAACGTGGAAATGTTA
 TGTAAGAATTTGAATCCCAGGTGTGGGATATGAGGCTGCTTCAGTCTGTTCACTGCAGNTATGATTTGC
 CTCGTGCTCTAGCAGAGGCGTGATTTTGCCAGCCTGCTTGGACCCTGCGACCCGCCTCCAGTTTCCATA
 GG TACCACTCCCTATCANTGATAGAGAAAAGTGAAANTNGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAG
 AAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCC
 CTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATNGNAAAAGTGAAAG
 TNGAGTTTACCACTCCCTATCAGNGATAGAGAAAANTGAAANTCGAGTNTACCACTCCCTATCAGTGAT
 AGAGAAAANTGAAAGTCGAGCTCGGTACCCGGTTCGAGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGCCTTTATA
 AGCAGAGCTCGTTTGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATNCACGCTGTTTTGACCTNCATAG
 AAGACACCGGGACCGATCCAGCCTTAATTAAGGCGCGCCTAGCCCGGCTAGTCGAGCTCAAGCTTGGG
 ACCATGGCACTTCCAGAT

Anexo 3.2. Secuencia de la inserción del extremo 3' del transgén TRE-HA- β Nrx1 Δ C en el genoma de ratón

Oligonucleótidos utilizados:

- Sentido: 5' - ATCATCGTCCTTTCCTTGGCT - 3'
- Antisentido: 5' - CCTCCCTCCCAGACACGCTT - 3'

Leyenda:

- TRE-HA- β Nrx1 Δ C
- Fragmento invertido de TRE-HA- β Nrx1 Δ C
- intrón 1 de *Jam3*
- exón 1 de *Jam3*
- promotor de *Jam3*

CCCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGGCCCTTCGGCCCTCGTCCNCGGACCTTCTTCCC
 GCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTTCCGCGTCTTCGCTTTGTGGGGGGCTTTCCTCGTCGAGCTGTGC
 TGGCAGCCCCGGCCGCTCTGTCCCCATCGGCACANACCACACTTCCNAGCGGCACTGAANC
CTCACCCCTGAAGAGCAGCAGCAGGAAGAAGTCAGGCAGCCGCGCGTACAGTCGAAGTCGCAGCCGC
CGGCTCAGCGCCATGTGAGGGGAATGTGAGGGGCTCAGGCTCGGAGCGGAGAACC
CGCTCGTGCCG
 CATGCGCCCAGCCTGCTTGGACCCTGCGACCCGCCTCCAGTTTCCATAGCGACCACGCGGCCTCGGCCG
 AGCCGGCA

4. Abreviaturas

2-AG: 2-araquidonil glicerol

AEA: Araquidonoil etanolamina

AS4-: carencia del inserto en el sitio de splicing 4

AS4: sitio de splicing alternativo 4 de neurexinas

AS4+: inclusión del inserto en el sitio de splicing 4

ASD: siglas en inglés del TEA (Autism Spectrum Disorders)

BSA: Albúmina de suero bovino

CaMKII: Proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina tipo II

CaMKII-tTA: Transgén. Transactivador de la transcripción bajo el promotor CaMKII

Cblns: cerebelinas

CNVs: del inglés Copy Number Variants

CPu: Caudado putamen o estriado dorsal

DAB: Diaminobencidina

Dox: Doxiciclina

E/I: balance excitación/inhibición

eCB: endocannabinoide

GABA: acrónimo del inglés gamma-aminobutyric acid

GABAAR: receptor ionotrópico de GABA

GABABR: Receptor metabotrópico de GABA

HA- β Nrx1 Δ C: Proteína mutante de β Nrxn1 truncada en el dominio citoplásmico y etiquetada con HA

IEG: genes de expresión inmediata temprana. Acrónimo del inglés Immediate-early-gene

iTRAQ: *Isobaric tags for relative and absolute quantitation*

KO: knockout

LFP: Potencial de campo local. Acrónimo del inglés Local Field Potential.

LNS: Acrónimo del inglés laminin-neurexin-sex hormone binding globulin

LRRTMs: Leucine-rich-repeat transmembrane neuronal

mEPSCs: Corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura

mIPSCs: Corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura

MSNs: Acrónimo del inglés Medium Spiny Neurons

NAC: Núcleo accumbens o estriado ventral

NL: Neuroliquina

NL1 +B: Neuroliquina conteniendo el inserto de splicing alternativo B

NMDAR: Receptor de glutamato ionotrópico tipo NMDA

Nrxn: Neurexina

PrL: Corteza medial prefrontal prelímbica

PSD-95: de las siglas en inglés postsynaptic density-95

S1BF: corteza somatosensorial primaria Barrel

SEM: error estándar de la media

SHIRPA: SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital phenotype assessment

STR: Estriado

TEA: Trastornos del Espectro Autista

TKO: Triple knockout

TRE-HA- β Nrx1 Δ C

α Nrxn: alfa-neurexina

β Nrx1 Δ C: ratón doble transgénico TRE-HA- β Nrx1 Δ C;CaMKII-tTA

β Nrxn1 AS4-

β Nrxn1 AS4+

β Nrxn: beta-neurexina