




Reversión de los fenotipos de células, circuitos y crisis en un modelo de ratón de encefalopatía epiléptica *DNM1*

Recibido: 20 de febrero de 2023

Aceptada: 17 de agosto de 2023

Published online: 30 August 2023

 Buscar actualizacionesKatherine Bonnycastle^{1,2,3,5}✉, Katharine L. Dobson^{1,2,3},Eva-Maria Blumrich^{1,2,3}, Akshada Gajbhiye⁴, Elizabeth C. Davenport^{1,2,3}, Marie Pronot^{1,2,3}, Moritz Steinruecke^{1,2,3}, Matthias Trost⁴,Alfredo González-Sulser^{1,2,3} y Michael A. Cousin^{1,2,3}✉

La dinamina-1 es una GTPasa de gran tamaño con un papel obligatorio en la endocitosis de vesículas sinápticas en terminales nerviosas de mamíferos. Las mutaciones erróneas heterocigóticas en el gen de la dinamina-1 (*DNM1*) causan una nueva forma de encefalopatía epiléptica, y las mutaciones patogénicas se agrupan en regiones necesarias para su actividad GTPasa esencial. Revelamos que la mutación patogénica más prevalente *del DNM1*, R237W, interrumpe la actividad enzimática de la dinamina-1 y la endocitosis cuando se sobreexpresa en neuronas centrales. Para determinar cómo esta mutación

Para evaluar el impacto sobre la función celular, circuital y conductual, hemos generado un ratón portador de la mutación R237W. Las neuronas de los ratones heterocigotos muestran endocitosis disfuncional, además de una neurotransmisión excitatoria alterada y fenotipos similares a las convulsiones. Es importante destacar que estos fenotipos se corrigen a nivel celular, de circuito e in vivo mediante el fármaco BMS-204352, que acelera la endocitosis. Aquí demostramos un vínculo creíble entre la endocitosis disfuncional y la encefalopatía epiléptica y, lo que es más importante, revelamos que el reciclaje de vesículas sinápticas puede ser una diana terapéutica viable para las epilepsias monogénicas intratables.

Las mutaciones erróneas patogénicas heterocigotas en el gen *DNM1* dan lugar a una forma específica de encefalopatía epiléptica del desarrollo, caracterizada por discapacidad intelectual de grave a profunda, hipotonía y epilepsia¹⁻³. La epilepsia en estos individuos suele comenzar con espasmos infantiles que progresan hacia el síndrome de Lennox-Gastaut. El gen *DNM1* codifica la gran GTPasa dinamina-1, una enzima mecanoquímica que experimenta un cambio conformacional en la hidrólisis de GTP, proporcionando fuerza para las etapas finales de la fisión de vesículas^{4,5}. Tiene una estructura modular con un dominio GTPasa N-terminal, seguido de dominios esenciales para el autoensamblaje (dominios efector medio y GTPasa, GED), la unión a lípidos de membrana (homología pleckstrin, PH) y las interacciones proteicas

(dominio C-terminal rico en prolina). Todos los dominios desempeñan papeles clave en la mediación de la función de la dinamina-1⁶⁻⁹, sin embargo su actividad GTPasa es esencial para la reacción de fisión del SV durante la endocitosis^{4,5}. Hasta la fecha, todas las mutaciones patogénicas identificadas en el gen *DNM1* se localizan en el dominio GTPasa o en el dominio medio, con una en cada uno de los dominios PH y GED^{10,11}. Es importante destacar que casi todos los individuos con estas mutaciones en *DNM1* padecen epilepsia intratable¹, por lo que la identificación de nuevas intervenciones terapéuticas constituye un reto urgente.

Teniendo en cuenta el papel esencial de la dinamina-1 en la endocitosis del SV y la agrupación de mutaciones en el dominio GTPasa en individuos con encefalopatía epiléptica, una predicción lógica es que los defectos en el dominio GTPasa de la dinamina-1 en individuos con encefalopatía epiléptica pueden deberse a la presencia de mutaciones en el dominio GTPasa.

the Developing Brain, Hugh Robson Building, George Square, University of Edinburgh, EH8 9XD Edimburgo, Escocia, Reino Unido. ³Centro de Epilepsia Muir Maxwell, Hugh Robson Building, George Square, Universidad de Edimburgo, EH8 9XD Edimburgo, Escocia, Reino Unido. ⁴Instituto de Biociencias de la Universidad de Newcastle, Facultad de Ciencias Médicas, NE2 4HH Newcastle upon Tyne, Reino Unido. ⁵Dirección actual: Servicio de Genética Médica, Centro Hospitalario Universitario (CHU) Sainte-Justine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canadá. ✉ e-mail: Katherine.Bonnycastle@gmail.com M.Cousin@ed.ac.uk

en la endocitosis del SV sustentan este trastorno. Sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado el papel de estas mutaciones dominantes negativas del dominio GTPasa a nivel neuronal, de circuito o de comportamiento. Para investigar esto, generamos un ratón portador de la mutación más prevalente en el gen *DNM1* (R237W).

En este trabajo, los ratones heterocigotos *Dnm1*^(+/R237W) muestran endocitosis de SV defectuosa, neurotransmisión alterada y actividad convulsiva. Es importante destacar que estos fenotipos se revierten con la pequeña molécula BMS-204352, que acelera la endocitosis de SV. Por lo tanto, revelamos un modelo preclínico y una terapia potencial que impulsará futuros estudios de cribado de moléculas pequeñas y ensayos clínicos para generar intervenciones para la encefalopatía epiléptica *DNM1*.

Resultados

R237W dynamin-1 muestra una actividad GTPasa basal reducida Las mutaciones heterocigotas en el gen *DNM1* dan lugar a una forma específica de encefalopatía epiléptica¹, sin embargo, se sabe poco sobre cómo estas mutaciones se traducen en este trastorno del neurodesarrollo. Para determinar esto, investigamos la mutación patogénica más prominente *del DN1* en la enfermedad humana-R237W^{1,2}. El residuo R237 es crítico para la función GTPasa, participando directamente en la unión a GTP y estabilizando el estado de transición de esta región durante la hidrólisis de GTP¹². Debido a este papel clave, pensamos que la sustitución de un residuo más grande como R237W alteraría la actividad GTPasa. Para comprobarlo, ensayamos la actividad GTPasa de la dinamina-1 completa en un sistema de expresión heterólogo. Decidimos utilizar la variante de empalme dynamin-1a, ya que esta versión es la isoforma predominante en el cerebro de mamíferos³. Esta versión de la dinamina-1 se fusionó a la proteína fluorescente mCerulean (Dyn1-mCer) y luego se inmunoprecipitó utilizando nanocuerpos contra la fracción mCer. Como control positivo, evaluamos la capacidad del mutante K44A dynamin-1 (que es deficiente tanto en la unión como en la hidrólisis de GTP¹³) para hidrolizar GTP. Cuando se realizaron estos experimentos, se descubrió un nivel de actividad GTPasa basal en los inmunoprecipitados de la proteína mCer. Sin embargo, esta actividad se duplicó en los inmunoprecipitados de Dyn1_{WT}-mCer (Fig. 1a, b). Por el contrario, el mutante Dyn1_{K44A}-mCer mostró una capacidad significativamente reducida para hidrolizar GTP (Fig. 1a). Es importante destacar que Dyn1_{R237W}-mCer mostró una actividad GTPasa reducida a un nivel similar a Dyn1_{K44A}-mCer (Fig. 1b). Por lo tanto, la mutación R237W interrumpe la actividad GTPasa de la dinamina-1.

La dinamina-1 R237W es dominante-negativa para la endocitosis de SV La actividad GTPasa de la dinamina-1 es esencial para la endocitosis de SV⁵. Para determinar si Dyn1_{R237W} ejerce un efecto dominante-negativo en este proceso, y en un intento de imitar a los individuos heterocigotos con mutaciones *DNM1*, se sobreexpresaron mutantes Dyn1-mCer en cultivos primarios de neuronas del hipocampo, 2-3 veces por encima de la dinamin-1 endógena (Fig. suplementaria 1a,b). Para monitorizar el reciclaje del SV dependiente de la actividad se utilizó el reporte genéticamente codificado sinaptofisina-pHluorina (syHy). SyHy es la proteína de SV sinaptofisina que tiene una GFP exquisitamente sensible al pH insertada en un dominio luminal¹⁴. El interior ácido de los SV provoca el apagamiento de la fluorescencia de syHy en los terminales nerviosos en reposo. Durante la exocitosis del SV, el reportero se expone al espacio extracelular y el subsiguiente desvanecimiento proporciona una lectura de la fusión del SV. SyHy permanece fluorescente durante la endocitosis y se apaga con la acidificación del SV recién formado. La velocidad de endocitosis del SV es limitante en comparación con la acidificación del SV^{14,15}, lo que significa que la pérdida de fluorescencia de syHy es indicativa de la velocidad de endocitosis del SV.

Las neuronas fueron desafiadas con un tren de 300 potenciales de acción (10 Hz) con el total de reciclaje SV piscina revelada por la posterior aplicación de una solución alcalina (NH₄Cl). Las neuronas que expresaban el vector vacío mCer mostraban una respuesta syHy típica, con un rápido aumento de la fluorescencia (que reflejaba la exocitosis de SV) seguido de una lenta disminución (endocitosis de SV, Fig. 1c). Cuando las neuronas que sobreexpresaban

Dyn1_{WT}-mCer, no se observaron diferencias ni en la endocitosis de SV (medida como la cantidad de syHy que quedaba por recuperar (Fig. 1c, d), ni en la exocitosis de SV (medida como la extensión del pico de syHy evocado como proporción de la reserva total de SV, Fig. 1e). En las neuronas que expresan Dyn1_{K44A}-mCer, la endocitosis de SV se retrasó significativamente, mientras que la exocitosis de SV no se vio afectada (Fig. 1c-e). Cuando se evaluaron las neuronas que sobreexpresaban Dyn1_{R237W}-mCer, la endocitosis de SV se redujo en gran medida en comparación con el control Dyn1_{WT}-mCer, sin ningún efecto significativo sobre la exocitosis de SV (Fig. 1f-h). Por el contrario, la sobreexpresión de un mutante de dynamin-1 de dominio medio (A408T), procedente del ratón *Fitful*¹⁶ que tiene una actividad GTPasa normal (Fig. suplementaria 1c), no tuvo un impacto dominante-negativo ni en la endocitosis ni en la exocitosis de SV (Fig. suplementaria 1d-f). Por lo tanto, el mutante patogénico de la GTPasa *DNM1* R237W, tiene un efecto selectivo, dominante-negativo sobre la endocitosis de SV.

Los ratones *Dnm1*^(+/R237W) muestran una endocitosis de SV defectuosa La sobreexpresión de Dyn1_{R237W}-mCer en neuronas *Dnm1*^(+/+) recapitula con exactitud la situación in vivo, en la que esta mutación se expresaría a través de su locus endógeno. Además, no permite una investigación directa de cómo una endocitosis reducida de SV podría culminar en una encefalopatía epiléptica. Para abordar esto, generamos una línea de ratón que expresaba un alelo *Dnm1*^(R237W), utilizando la tecnología CRISPR-Cas9. Los ratones heterocigotos *Dnm1*^(+/R237W) fueron fértiles y nacieron en proporciones mendelianas. No se observaron alteraciones macroscópicas en la arquitectura cerebral mediante tinción de Nissl (Fig. 2a). Además, el ratón *Dnm1*^(+/R237W) no es un hipomorfo, ya que los análisis cuantitativos de Western blot y espectrometría de masas no revelaron cambios en la expresión de dynamin-1 ni en neuronas hipocámpicas primarias de ratones *Dnm1*^(+/R237W), ni en lisados cerebrales de ratones *Dnm1*^(+/R237W) de 3 o 6 semanas de edad (Fig. 2a, b) ni en terminales nerviosas *Dnm1*^(+/R237W) (Datos suplementarios 1).

El análisis por Western blot de las proteínas comunes de reciclaje del SV y de los socios de interacción de la dinamina-1 en neuronas hipocámpicas primarias de ratones *Dnm1*^(+/R237W) no reveló diferencias en sus niveles proteicos (Fig. 2b, c). Lo mismo ocurrió en los lisados cerebrales de ratones *Dnm1*^(+/R237W) de 3 o 6 semanas de edad (Fig. 2c-g). Para determinar cambios más globales en la expresión de proteínas presinápticas, se realizó una espectrometría de masas cuantitativa en terminales nerviosas aisladas de compañeros de camada *Dnm1*^(+/+) o *Dnm1*^(+/R237W) (Fig. 2d). Establecimos una lista de 4237 proteínas cuantificadas asociadas a sinapsis, mitocondrias y estructuras vesiculares y de transporte (Fig. suplementaria 3). Esto reveló 151 proteínas que estaban significativamente aumentadas en terminales nerviosas *Dnm1*^(+/R237W), con 39 significativamente disminuidas (Fig. 2e, Datos Suplementarios 1). Para identificar las funciones celulares que pueden estar reguladas o perturbadas, se realizó un análisis de red utilizando la herramienta web STRING (v.11.5) en las proteínas que estaban significativamente alteradas. Las proteínas reguladas al alza en las terminales nerviosas *Dnm1*^(+/R237W) se agruparon en torno a funciones celulares como el complejo central del proteasoma y la vía de señalización ErbB, mientras que las proteínas reguladas a la baja se asociaron con la vía de señalización del receptor acoplado a proteína G y el complejo dinactina (Fig. 2f). Por lo tanto, mientras que no hay cambios brutos en la arquitectura o la expresión de proteínas en los ratones *Dnm1*^(+/R237W), existen variaciones sutiles en sus terminales nerviosas que pueden reflejar una señalización celular alterada o posibles mecanismos compensatorios.

Cuando se examinaron secciones del cerebro hipocámpico de ratones *Dnm1*^(+/R237W) a nivel ultraestructural, sus terminales nerviosas mostraban repetidamente SV deformes y compartimentos endosómicos, en contraste con los controles *Dnm1*^(+/+) (Fig. 3a). Cuando se cuantificó, hubo un aumento del 250% en el número de endosomas presinápticos en los terminales nerviosos *Dnm1*^(+/R237W) en comparación con los controles de la camada (Fig. 3b). También hubo un pequeño (17%) pero significativo aumento en el número de SVs (Fig. 3c). Los SVs en las terminales nerviosas *Dnm1*^(+/R237W) eran más grandes que en los controles *Dnm1*^(+/+) (Fig. 3d), sin cambios significativos en el área del endosoma (Fig. Suplementaria 4a). Este fenotipo morfológico sugería

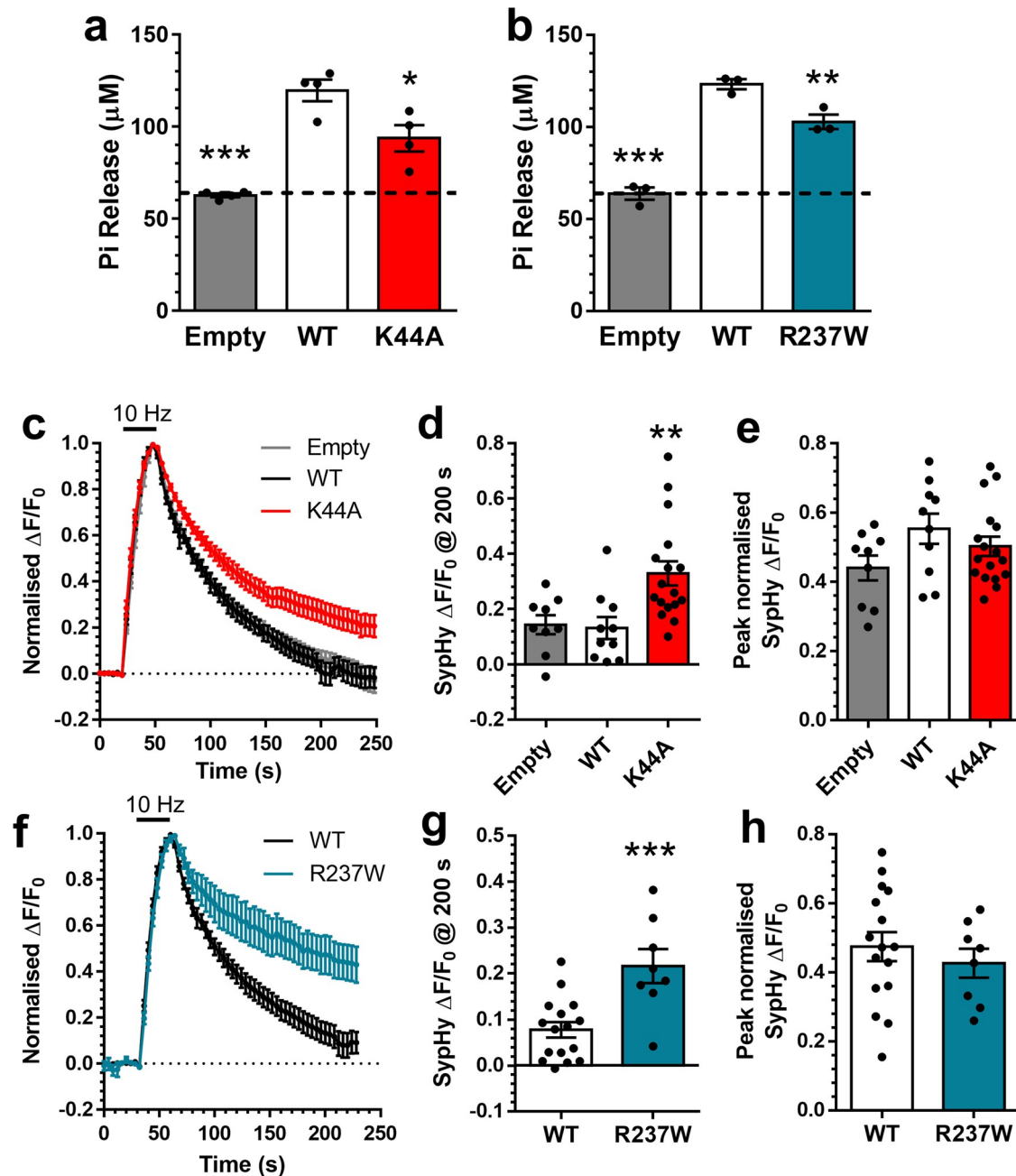
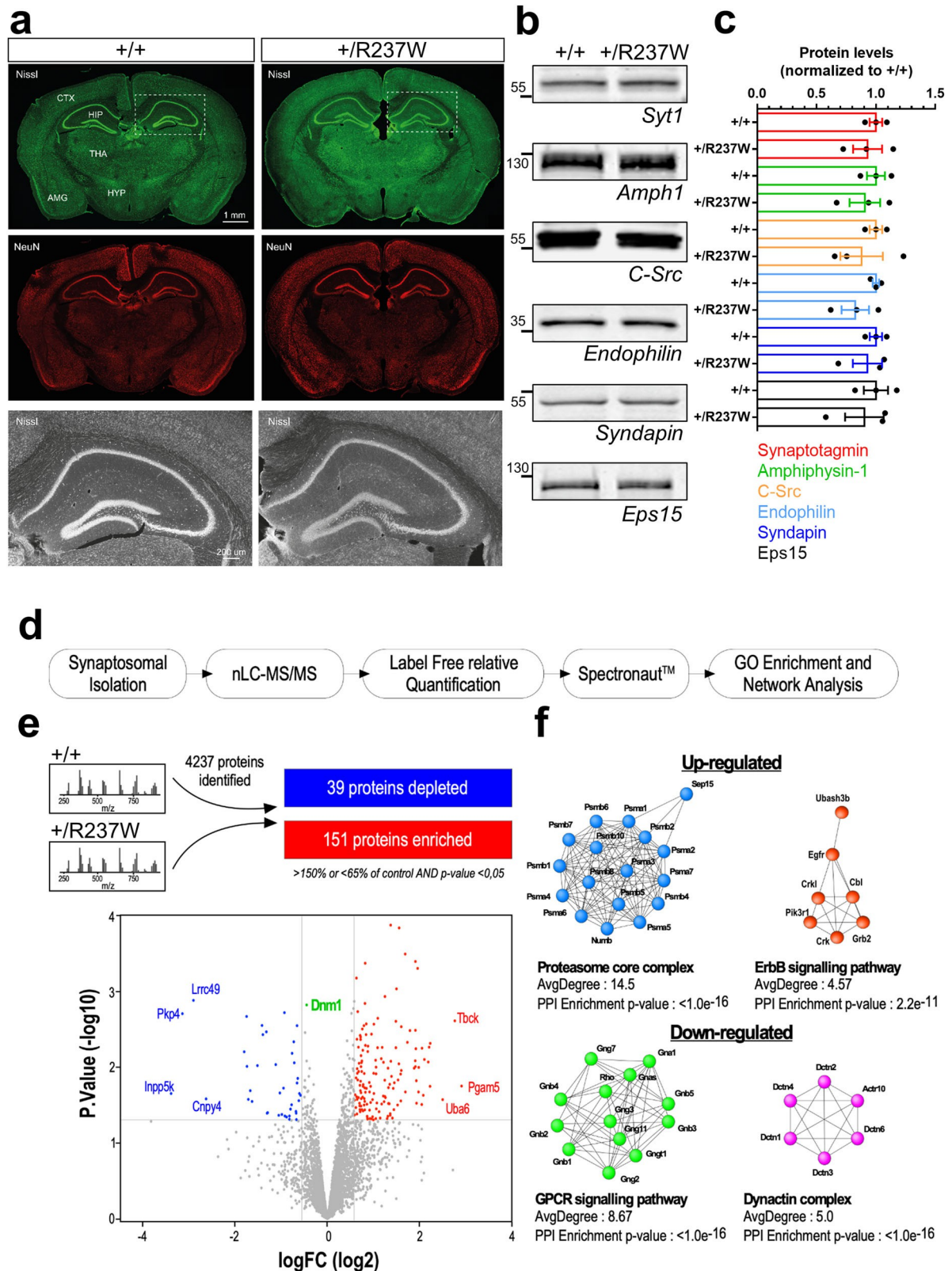


Fig. 1 | La mutación R237W del dominio GTPasa de *Dnm1* afecta a la endocitosis de SV de dominante-negativa. **a**, **b** Las células HEK293T fueron transfectadas con mCer (vacío), Dyn1_{WT}-mCer, Dyn1_{K44A}-mCer o Dyn1_{R237W}-mCer. Tras 48 h, las células se lisaron y se inmunoprecipitó mCer. La actividad GTPasa del inmunoprecipitado se muestra como Pi liberada \pm SEM (ANOVA unidireccional, **a**) todos los $n=4$ experimentos separados, *** $p < 0.0001$ WT to Empty, * $p = 0.0138$ WT to K44A; **b**) todos los $n=3$ experimentos separados, *** $p < 0.0001$ WT to Empty, ** $p = 0.0093$ WT to R237W). **c-h** Se transfectaron cultivos primarios de neuronas del hipocampo con sinaptofisina-pHluorina (sypHy) y mCer (Empty), Dyn1_{WT}-mCer, Dyn1_{K44A}-mCer o Dyn1_{R237W}-mCer entre 11 y 13 DIV. Entre 13 y 15 DIV, se estimularon los cultivos con un tren de 300 potenciales de acción (10 Hz). Los cultivos recibieron pulsos de

con tampón de imagen NH_4Cl 180 s después de la estimulación. **c**, **f** Respuesta sypHy media ($\Delta F/F_0 \pm$ SEM) normalizada con respecto al pico de estimulación. La barra indica la estimulación (**c**, $n=9$ Empty, $n=10$ Dyn1_{WT}-mCer, $n=17$ Dyn1_{K44A}-mCer; **f**, $n=16$ Dyn1_{WT}-mCer, $n=8$ Dyn1_{R237W}-mCer). **d**, **g** Nivel medio de fluorescencia sypHy ($\Delta F/F_0 \pm$ SEM) a 200 s (**d** ANOVA unidireccional, $n=9$ Empty, $n=10$ Dyn1_{WT}-mCer, $n=17$ Dyn1_{K44A}-mCer, ** $p = 0.0046$ WT a K44A; **g** Prueba *t* de dos caras no apareada, $n=16$ Dyn1_{WT}-mCer, $n=8$ Dyn1_{R237W}-mCer, *** $p = 0.0007$). **e**, **h** El nivel máximo de fluorescencia sypHy ($\Delta F/F_0 \pm$ SEM) normalizado con el desafío NH_4Cl (**e** ANOVA de una vía, $n=9$ Empty, $n=10$ Dyn1_{WT}-mCer, $n=17$ Dyn1_{K44A}-mCer, todos ns; **h** Prueba *t* de dos caras no apareada, $n=16$ Dyn1_{WT}-mCer, $n=8$ Dyn1_{R237W}-mCer, $p = 0.48$).

que había un déficit en la endocitosis de SV, por lo que se prepararon cultivos hipocámpales primarios de ratones *Dnm1*^{+/R237W} y compañeros de camada *Dnm1*^{+/+}. Al igual que antes, se monitorizaron la exocitosis y endocitosis de SV utilizando el reportero sypHy (Fig. 3e). Las neuronas de ratones *Dnm1*^{+/R237W} mostraron una ralentización significativa de la endocitosis de SV durante la aplicación de dos trenes de estímulos diferentes (300 potenciales de acción a 10 Hz o 400 potenciales de acción a 40 Hz, Fig. 3f, g, i, j). Además

no hubo ningún efecto significativo sobre la exocitosis de SV durante ninguno de los dos trenes de estímulos (Fig. 3h, k). Este también fue el caso cuando la exocitosis de SV se aisló en presencia de bafilomicina A1, que previene la acidificación de los SV tras la endocitosis, eliminando la contaminación de los SV que se recuperan¹⁷ (Fig. suplementaria 4b-e). Por lo tanto, las neuronas *Dnm1*^{+/R237W} muestran un defecto específico en la endocitosis de SV a través de un rango de frecuencias de estímulo.



Para confirmar el defecto de endocitosis mediante un enfoque complementario, se realizó un análisis morfológico utilizando la captación dependiente de la actividad del marcador de fase fluida peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras su acumulación, la HRP puede convertirse en un producto denso en electrones, para revelar el número de intermediarios endocíticos generados durante la estimulación¹⁸. Estudios recientes han revelado que la mayoría de los intermediarios formados directamente a partir del plasma presináptico

de la membrana son endosomas, que a su vez desprenden SVs para rellenar el pool de reciclaje^{19,20}. Las neuronas *Dnm1*^(+/R237W) mostraron una reducción significativa de endosomas marcados con HRP en comparación con los controles *Dnm1*^{+/+} (Fig. 3l-n), sin cambios en el tamaño de los endosomas HRP (Fig. suplementaria 4f), lo que indica que la generación de endosomas dependiente de la actividad se vio afectada. Por lo tanto, las neuronas *Dnm1*^(+/R237W) tienen un déficit intrínseco y específico en la endocitosis de SV.

Fig. 2] Los ratones *Dnm1*^{+/R237W} no muestran anomalías macroscópicas pero sí una expresión proteica alterada. a Se fijaron por perfusión cerebros de ratones *Dnm1*^{+/+} y *Dnm1*^{+/R237W} de 2 meses de edad y se tiñeron secciones cerebrales de 50 μ m con Nissl y un anticuerpo NeuN para etiquetar la arquitectura neuronal macroscópica. La corteza (CTX), el tálamo (THA), el hipotálamo (HYP), la amígdala (AMG) y el hipocampo (HPC) están marcados, barra de escala 1 mm. Los paneles inferiores representan imágenes ampliadas del hipocampo, barra de escala 200 μ m. b, c Se prepararon lisados a partir de cultivos primarios de neuronas hipocámpales preparadas a partir de embriones *Dnm1*^{+/+} y *Dnm1*^{+/R237W} y se analizaron mediante blot para detectar proteínas pre-sinápticas comunes y socios de interacción de dynamin-1. b En los blots representativos se muestran los niveles de sinaptotagmina-1 (Syt1), anfitrión-1 (Amph1), C-src, endofilina, sindapina y Eps15. c Cuantificación de los niveles de proteínas normalizados con respecto a *Dnm1*^{+/+} \pm SEM ($n = 3$ cultivos independientes para todos, todos ns, prueba de Mann-Whitney de dos caras). d, e Flujo de trabajo del análisis proteómico cuantitativo. El contenido total de proteínas se limpió

en un gel SDS-PAGE antes de la digestión triptica. Las proteínas se analizaron mediante MS en tándem de alta resolución, y las diferencias significativas se revelaron mediante una prueba t no apareada de dos caras corregida para comparaciones múltiples. e El diagrama de volcán muestra 4.237 proteínas cuantificadas, 39 de las cuales se redujeron en *Dnm1*^{+/R237W} (azul), mientras que 151 se enriquecieron (rojo). El nivel de *Dnm1* se muestra en verde. f Análisis de la red STRING de proteínas reguladas al alza y a la baja en sinaptosomas *Dnm1*^{+/R237W}. Los subcomplejos resultantes se sometieron a la agrupación MCL a granulosidad 4, lo que dio lugar a 18 agrupaciones, incluidas 2 agrupaciones con una media superior a 4 para las proteínas reguladas al alza (complejo central del proteasoma, vías de señalización ErbB) y seis agrupaciones, incluidas dos agrupaciones con una media superior a 4 para las proteínas reguladas a la baja (vía de señalización GPCR, complejo diactina). Los datos de origen se proporcionan como archivo de datos de origen.

Los ratones *Dnm1*^{+/R237W} tienen alterada la neurotransmisión excitatoria. La endocitosis de SV es esencial para mantener la liberación de neurotransmisores^{21,22}, por lo que predijimos que los defectos de endocitosis observados en las neuronas *Dnm1*^{+/R237W} se traducirían en una neurotransmisión disfuncional. Para determinar esto, examinamos la neurotransmisión en la sinapsis excitativa CA3-CA1 del colateral de Schaffer, utilizando grabaciones de patch clamp de células enteras. Primero determinamos las propiedades intrínsecas de las neuronas *Dnm1*^{+/R237W} (Tabla Suplementaria 1). La mayoría de los parámetros no se vieron afectados, sin embargo se detectaron diferencias tanto en Tau (tiempo de decaimiento de la membrana) como en capacitancia (tamaño celular). Las alteraciones en la capacitancia pueden reflejar una endocitosis disfuncional, mientras que el elevado valor de Tau sugiere que la membrana plasmática tarda más en cargarse, lo que refleja una disminución de la excitabilidad celular. Este aumento de Tau es coherente con el aumento de la anchura de la mitad de los potenciales de acción en las neuronas *Dnm1*^{+/R237W}, además de la velocidad de decaimiento y el tiempo de subida (Tabla suplementaria 1). Por lo tanto, las neuronas *Dnm1*^{+/R237W} muestran alteraciones en sus propiedades intrínsecas, que pueden ser una adaptación a defectos a nivel celular o de circuito. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la cantidad de corriente necesaria para desencadenar el disparo del potencial de acción entre las sinapsis *Dnm1*^{+/R237W} y *Dnm1*^{+/+} cuando se cuantificó la frecuencia de espigas o la reobase (Fig. 4a-c, Tabla suplementaria 1). Por lo tanto, el alelo *Dnm1*^{R237W} no provoca una hiperexcitabilidad intrínseca de las neuronas *Dnm1*^{+/R237W}.

A continuación investigamos las corrientes postsinápticas inhibitorias o excitatorias en miniatura (mEPSCs, mIPSCs) en las neuronas CA1, ya que pueden reflejar deficiencias en el reciclaje de SV. La frecuencia, pero no la amplitud, de las mEPSCs se redujo significativamente en las sinapsis *Dnm1*^{+/R237W} (Fig. 4d-f), sugiriendo un defecto presináptico en el reciclaje del SV sin un fenotipo postsináptico obvio. Por el contrario, no observamos diferencias significativas en la frecuencia de eventos mIPSC y un aumento en la amplitud mIPSC en las sinapsis *Dnm1*^{+/R237W} (Fig. 4g-i). Esto sugiere que hubo una perturbación selectiva de la neurotransmisión excitatoria en los ratones *Dnm1*^{+/R237W}. Para determinar esto, evaluamos si la neurotransmisión excitatoria o inhibitoria evocada se veía afectada en los ratones *Dnm1*^{+/R237W}. Sorprendentemente, las sinapsis *Dnm1*^{+/R237W} mostraron un aumento de las amplitudes EPSC evocadas en un rango de intensidades de estímulo (Fig. 4j, k). Por el contrario, las sinapsis *Dnm1*^{+/R237W} no mostraron ninguna alteración en la amplitud IPSC evocada a través de un rango idéntico de estímulos (Fig. 4l, m). Finalmente, determinamos la relación de pulsos emparejados (PPR) para la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria aplicando pares de pulsos en un rango de intervalos entre estímulos. Este análisis reveló una disminución significativa de la EPSC PPR y un aumento significativo de la IPSC PPR en *Dnm1*^{+/R237W} sinapsis en comparación con *Dnm1*^{+/+} (Fig. 5a-d). Esto sugiere que la presencia del alelo *Dnm1*^{R237W} resulta en un aumento de la probabilidad de liberación (Pr) para la neurotransmisión excitativa y una disminución de la Pr para la neurotransmisión inhibitoria, proporcionando un mecanismo potencial para la excitabilidad desequilibrada en estas sinapsis.

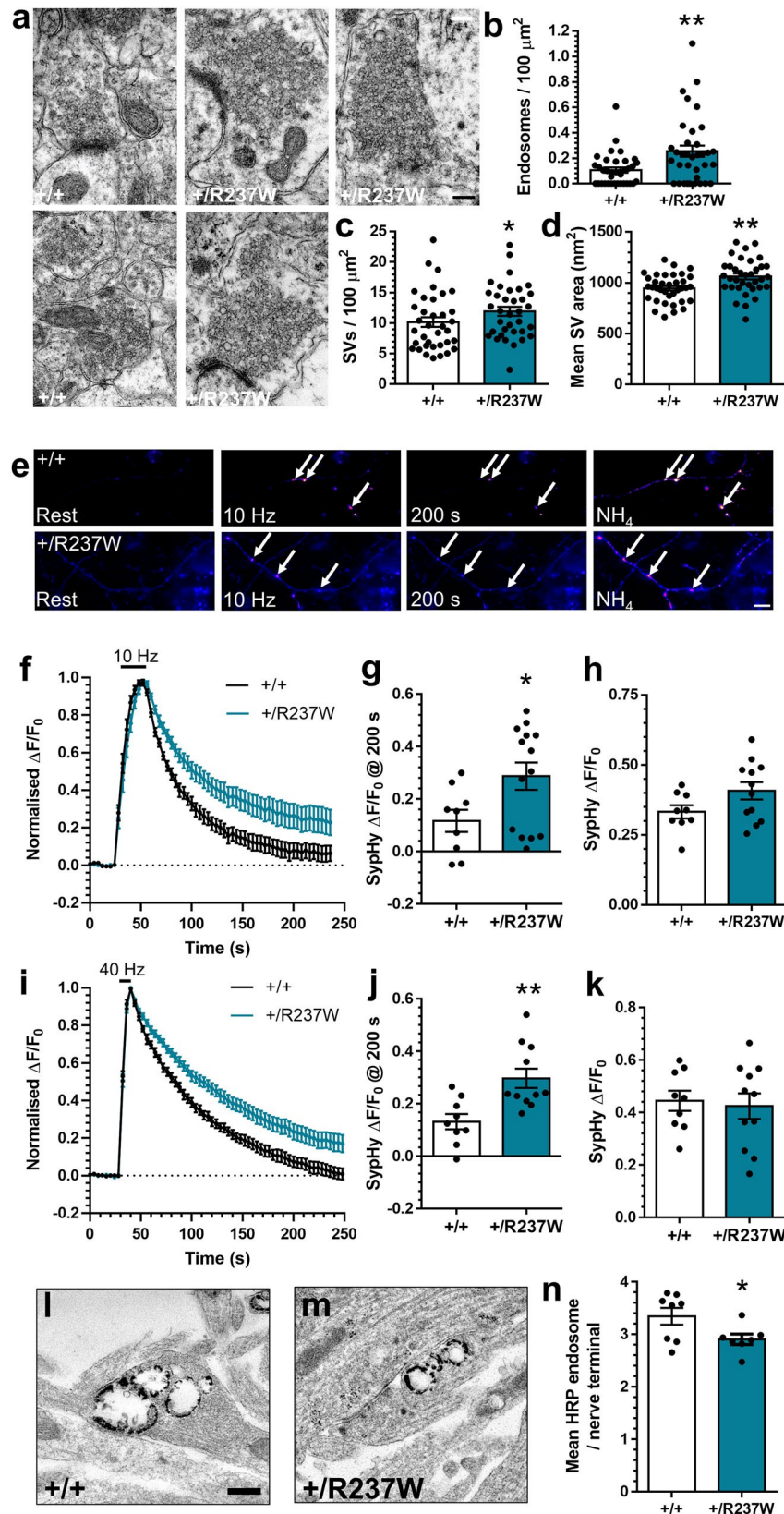
Dado que las sinapsis *Dnm1*^{+/R237W} parecen haber aumentado la neurotransmisión excitatoria a través de una gama de estímulos, a continuación investigamos si la neurotransmisión podría mantenerse durante un tren prolongado de potenciales de acción de alta frecuencia (600 APs a 40 Hz). *Dnm1*^{+/R237W}

mostraron una incapacidad para soportar la neurotransmisión durante el tren de estímulos, en comparación con los controles *Dnm1*^{+/+} (Fig. 5e-g). Este hallazgo, cuando se considera con la PPR reducida, podría deberse a un aumento de Pr, o a una incapacidad para reponer las reservas de SV. Para determinar esto, la amplitud de la primera EPSC evocada se dividió por el tamaño efectivo de la reserva fácilmente liberable (RRP), estimada a partir del tren de potenciales de acción de 40 Hz²³ (Fig. 5g). La Pr no se vio afectada en los circuitos *Dnm1*^{+/R237W} (Fig. 5a complementaria), mientras que tanto el tamaño como la tasa de reposición del RRP se redujeron significativamente (Fig. 5h,i). Por lo tanto, la neurotransmisión excitatoria en los circuitos *Dnm1*^{+/R237W} aumenta inicialmente (muy probablemente a través del aumento de Pr), sin embargo, esta mejora no puede mantenerse durante un tren de potencial de acción (muy probablemente a través de la endocitosis reducida de SV), lo que resulta en su depresión.

Los ratones *Dnm1*^{+/R237W} muestran saltos mioclónicos. Las mutaciones heterocigóticas en el gen *DNM1* causan encefalopatías epilépticas^{1,2}. Sin embargo, muchos modelos preclínicos en roedores de epilepsias monogénicas y trastornos del neurodesarrollo no recapitulan la actividad convulsiva observada en individuos con estos trastornos²⁴. Cuando se examinan, los ratones *Dnm1*^{+/R237W} no muestran convulsiones tónico-clónicas espontáneas manifiestas, sin embargo sí muestran "saltos mio-clónicos", que implican ráfagas de saltos muy activos (Fig. 6a, Película suplementaria 1). Es importante destacar que los registros electrofisiológicos in vivo de los ratones *Dnm1*^{+/R237W} durante estos saltos mio-clónicos revelaron un aumento de la actividad generalizada de picos durante estos eventos (Fig. 6b). Los ratones *Dnm1*^{+/R237W} tenían una mayor potencia durante los eventos de "salto mioclónico" en las bandas delta y theta de baja frecuencia en comparación con los raros eventos de salto observados en los ratones *Dnm1*^{+/+} (Fig. 6c, d). Las bandas de baja frecuencia no están asociadas con la actividad muscular, lo que sugiere que el aumento de potencia observado durante el salto mioclónico no es una consecuencia del salto per se. Además, la actividad electrofisiológica asociada al salto mioclónico en los ratones *Dnm1*^{+/R237W} fue también más larga que en los ratones *Dnm1*^{+/+} (Fig. 6e). En conjunto, esto sugiere que este comportamiento es consecuencia de la hiperexcitabilidad y de una posible actividad convulsiva. Por lo tanto, el ratón *Dnm1*^{+/R237W} tiene validez tanto de construcción como de cara como modelo preclínico de la encefalopatía epiléptica *DNM1*.

El BMS-204352 corrige los fenotipos en ratones *Dnm1*^{+/R237W}

Los fenotipos presinápticos y de circuito observados en los ratones *Dnm1*^{+/R237W} apoyan firmemente que la endocitosis disfuncional del SV es el motor clave de los saltos mioclónicos observados en los ratones *Dnm1*^{+/R237W}. Por lo tanto, a continuación determinamos si la corrección de la endocitosis del SV podría restaurar la neurotransmisión normal y eliminar los fenotipos conductuales observados. La pequeña molécula BMS-204352 ((3S)-(+)-(5-cloro-2-metoxifenil)-1,3-dihidro-3-fluoro-6-(trifluorometil)-2H-indol-2-ona) fue elegida para esta tarea ya que es una terapéutica segura para su uso en humanos²⁵ y puede corregir defectos de comportamiento en un modelo preclínico del síndrome X frágil²⁶. Este último efecto nos llevó a investigar su acción, ya que varios sistemas modelo del síndrome X frágil muestran hiperexcitabilidad del circuito²⁷. En primer lugar, examinamos el efecto del BMS-204352



en cultivos primarios de neuronas hipocámpicas *Dnm1*^(+/+) que sobreexpresan tanto Dyn₁^{WT}-mCER como syHy. Curiosamente, se observó una aceleración dependiente de la dosis de la endocitosis de SV en puntos temporales tras la estimulación, observándose también una reducción de la exocitosis de SV en la dosis más alta (Fig. suplementaria 5b-d). Por lo tanto, el BMS-204352 puede tener el potencial de corregir defectos presinápticos en neuronas *Dnm1*^{+R237W}.

El BMS-204352 muestra efectos moduladores positivos tanto en los canales neuronales $K_{(v)7}$ como en los canales BK, mientras que es un modulador negativo tanto de los canales $K_{v7.1}$ como de los receptores GABA_A^{28,29}. Este espectro de actividad a través de múltiples subtipos de canales de potasio sugiere que puede acelerar la endocitosis de SV a través de una serie de mecanismos diferentes. Para determinar esto examinamos la endocitosis y exocitosis de SV en *Dnm1*^{+/+}

Fig. 3] Las neuronas *Dnm1*^{+/R237W} muestran endocitosis de SV disfuncional. a Cerebros de ratones *Dnm1*^{+/+} y *Dnm1*^{+/R237W} de 2 meses de edad fueron fijados por perfusión y procesados para microscopía electrónica. Las imágenes representativas muestran endosomas agrandadas en terminales nerviosas hipocámpales excitatorias *Dnm1*^{+/R237W}, barra de escala 250 nm. El número de SV presinápticos (b) y endosomas (c) y el tamaño (d) de los SV se cuantificaron ± SEM (*n* = 36 perfiles *Dnm1*^{+/+}, *n* = 35 *Dnm1*^{+/R237W}, *b* *p* = 0,005, *c* *p* = 0,044 prueba de Mann-Whitney, *d* *p* = 0.0024 Prueba *t* bilateral no emparejada). c-i Los cultivos primarios de neuronas del hipocampo preparados a partir de embriones *Dnm1*^{+/+} y *Dnm1*^{+/R237W} se transfectoraron con sinaptofisina-pHluorina (syHy) entre 7 y 9 DIV, los cultivos se estimularon con un tren de (f-h) 300 potenciales de acción (10 Hz) o i-k 400 potenciales de acción (40 Hz). Los cultivos fueron pulsados con tampón de imagen NH₄Cl 180 s después de la estimulación. e Se muestran imágenes representativas de la respuesta syHy en neuronas *Dnm1*^{+/+} y *Dnm1*^{+/R237W} en reposo, durante estimulación a 10 Hz, a 200 s y durante NH₄Cl. Las flechas indican las terminales nerviosas que responden. Barra de escala 10.

f, i Respuesta media de syHy ($\Delta F/F_0 \pm$ SEM) normalizada con respecto al pico de estimulación (f, *n* = 9 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 12 *Dnm1*^{+/R237W}; i, *n* = 9 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 11 *Dnm1*^{+/R237W}). g, j Nivel medio de fluorescencia syHy ($\Delta F/F_0 \pm$ SEM) a 200 s (g Prueba de Mann-Whitney de dos caras, *n* = 9 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 12 *Dnm1*^{+/R237W} **p* = 0,045; j Prueba *t* de dos caras no apareada, *n* = 9 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 11 *Dnm1*^{+/R237W} ***p* = 0,003). (h, k) Nivel máximo de fluorescencia de syHy ($\Delta F/F_0 \pm$ SEM) normalizado con respecto a la provocación de NH₄Cl (h Prueba *t* de dos caras no apareada, *n* = 9 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 12 *Dnm1*^{+/R237W} *p* = 0,237; k Prueba *t* de dos caras no apareada, *n* = 9 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 11 *Dnm1*^{+/R237W} *p* = 0,751). l-n Las neuronas *Dnm1*^{+/+} y *Dnm1*^{+/R237W} se estimularon con un tren de 400 potenciales de acción (40 Hz) en presencia de 10 mg/ml de HRP. Imágenes representativas muestran endosomas marcados con HRP en terminales nerviosas *Dnm1*^{+/+} (l) y *Dnm1*^{+/R237W} (m), barra de escala 250 nm. n Número medio de endosomas marcados con HRP por terminal nerviosa ± SEM (Prueba *t* de dos caras no apareada, *n* = 8 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 7 *Dnm1*^{+/R237W} **p* = 0,039). Los datos de origen se proporcionan como Fuente Archivo de datos.

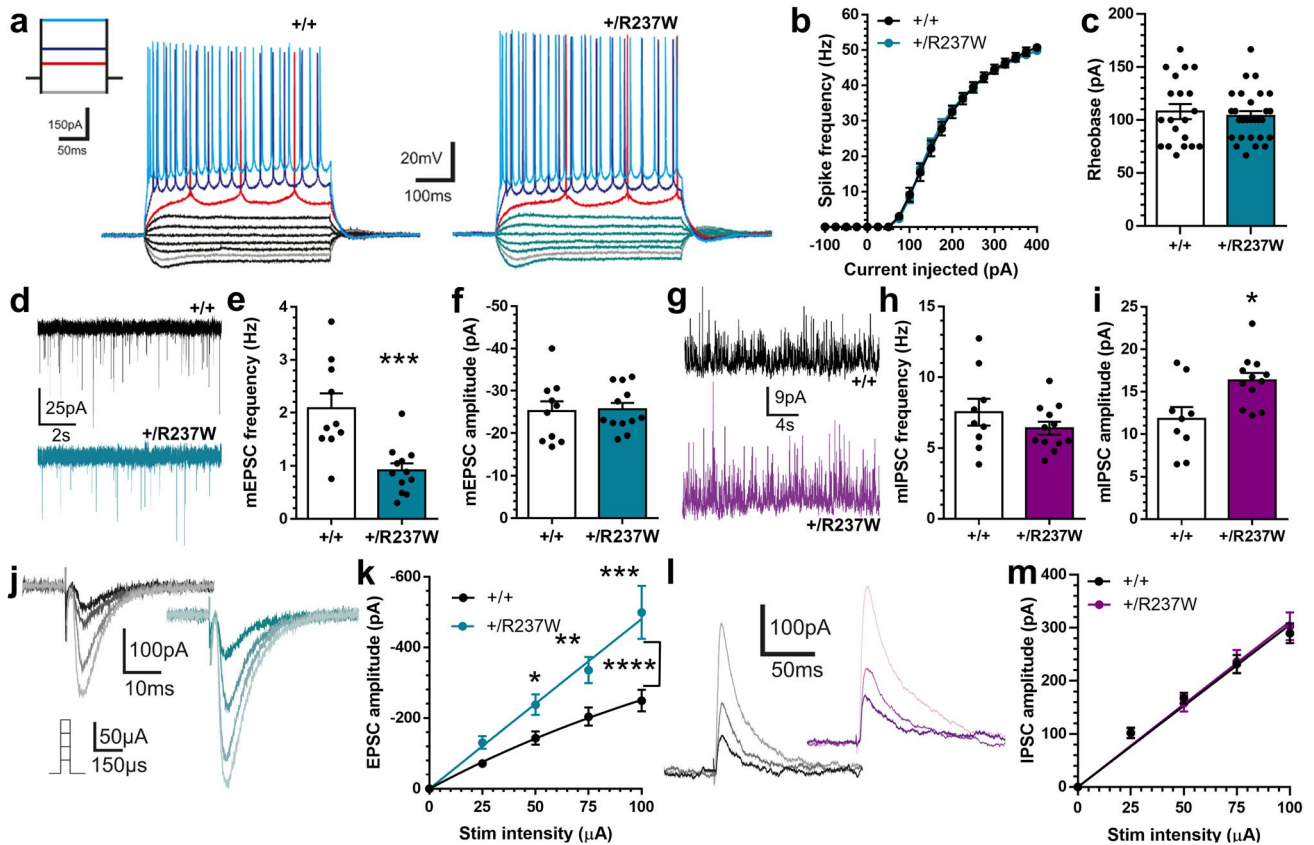


Fig. 4] Los ratones *Dnm1*^{+/R237W} muestran una neurotransmisión excitatoria disfuncional. La neurotransmisión en las sinapsis CA3/CA1 se monitorizó utilizando registros de patch clamp de células enteras en cortes agudos de hipocampo de ratones *Dnm1*^{+/+} y *Dnm1*^{+/R237W}. a Respuestas de voltaje representativas de neuronas piramidales CA1 en respuesta a inyecciones de corriente hiper/despolarizante de 500 ms, con frecuencia media de espigas (b) y reobase (c) ± SEM (*n* = 20 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 28 *Dnm1*^{+/R237W}, b ANOVA de dos vías, *p* = 0,997, c Prueba *t* de dos caras no apareada, *p* = 0,613). d Ejemplos de eventos mEPSC. Frecuencia media (e) y amplitud (f) de los eventos mEPSC ± SEM (Prueba de Mann-Whitney de dos caras, *n* = 10 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 12 *Dnm1*^{+/R237W}, b *p* = 0,0008, c *p* = 0,665). g Ejemplo de eventos mIPSC. Frecuencia (h) y amplitud (i) medias de los eventos mIPSC ± SEM (Two-sided

Prueba de Mann-Whitney, *n* = 9 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 12 *Dnm1*^{+/R237W}, h *p* = 0,379, i *p* = 0,023). j-m Se estimularon rodajas de hipocampo agudas a una serie de intensidades (25, 50, 75 y 100 μ A, tres repeticiones a cada intensidad, frecuencia 0,05 Hz) en un orden pseudoaleatorio. Se muestran trazos representativos (j) y amplitud EPSC evocada ± SEM (k) (ANOVA de dos vías con Fishers LSD, *n* = 34 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 39 *Dnm1*^{+/R237W}, *****p* = 0,018, **p* = 0,043 50 μ A, ***p* = 0,005 75 μ A, ****p* = 0,0004 100 μ A). Se muestran trazos representativos (l) y amplitud de IPSC evocada ± SEM (m) (ANOVA de dos vías con Fishers LSD, *n* = 40 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 40 *Dnm1*^{+/R237W}, en general y todas las comparaciones por pares. *isons* *p* > 0,92).

neuronas del hipocampo que expresaban syHy en presencia de una serie de moduladores de los canales de potasio. Estos fueron: dos agonistas del canal BK estructuralmente no relacionados (NS11021 y BMS-191011), un antagonista del canal BK (Paxilline), un activador del canal K_v7 (Retigabine), y un inhibidor del canal K_v7 (XE-991). Ningún modulador fue capaz de acelerar la endocitosis de SV de la manera observada con BMS-204352 (Fig. suplementaria 6). Por lo tanto, la acción del BMS-204352 sobre la endocitosis de los SV no se debe a la modulación de una clase específica de canales iónicos, lo que sugiere que su acción sobre la endocitosis de los SV no se debe a la modulación de una clase específica de canales iónicos.

los efectos presinápticos son una amalgama de la modulación de algunos o de todos estos canales, o un efecto fuera del objetivo aún no identificado.

Independientemente del mecanismo de del BMS-204352, a continuación examinamos si era capaz de corregir la endocitosis defectuosa de SV debida a la expresión del mutante R237W de dynamin-1. En primer lugar, determinamos su efecto en células *Dnm1*(+/+) que sobreexpresaban *Dyn1*(R237W)-mCER. Primero determinamos su efecto en células *Dnm1*(+/+) que sobreexpresaban *Dyn1*_{R237W}-mCER. En estos neuronas, el BMS-204352 restableció por completo la cinética de endocitosis del SV (Fig. 7a, b), lo que sugiere que puede ser una intervención viable para corregir la disfunción en el SV.

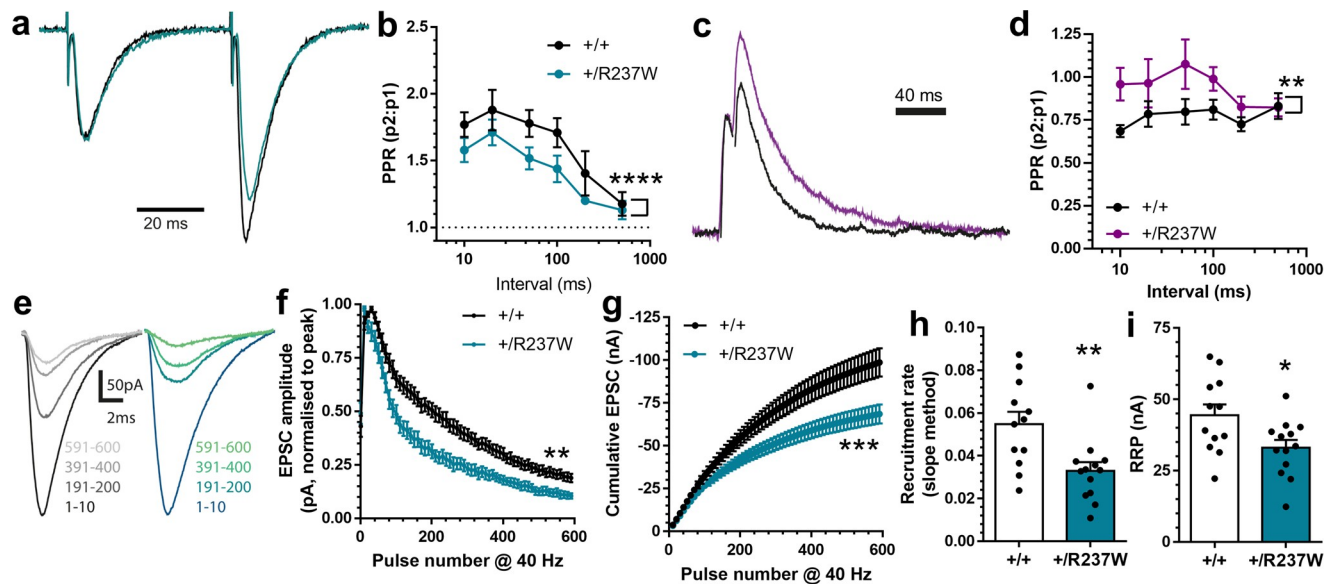


Fig. 5 | Los ratones *Dnm1*^{+/R237W} muestran una plasticidad a corto plazo alterada. La neurotransmisión en las sinapsis CA3/CA1 se monitorizó mediante el registro con patch clamp de células enteras en cortes agudos de hipocampo de ratones *Dnm1*^{+/+} y *Dnm1*^{+/R237W}. **a**, **b** Relación de pulsos emparejados (PPR) de EPSCs evocados en función del intervalo entre estímulos. (10–500 ms) ± SEM (ANOVA de dos vías con Fishers LSD, *n* = 11 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 10 *Dnm1*^{+/R237W}, *****p* < 0.0001). **c**, **d** PPR de IPSCs evocados en función del intervalo entre estímulos (10–500 ms) ± SEM (ANOVA de dos vías con Fishers LSD, *n* = 9 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 13 *Dnm1*^{+/R237W}, ***p* = 0.0018). Los cortes se estimularon con 600 APs

(40 Hz). Los trazos representativos (**e**) se muestran como medias de diez respuestas consecutivas de los intervalos de impulsos indicados. Se muestra la amplitud EPSC evocada media (**f**) normalizada a la respuesta pico ± SEM (ANOVA de dos vías, *n* = 12 *Dnm1*^{+/+}, *n* = 13 *Dnm1*^{+/R237W}, ***p* < 0.0043). **g** Regresión lineal en el último 1 s del gráfico EPSC acumulativo en (**f**) ± SEM (ANOVA de dos vías, *****p* < 0.0001). La tasa media de reposición de la reserva fácilmente liberable (RRP) (**h**) y el tamaño medio de la RRP (**i**) ± SEM se estimaron a partir del gráfico de regresión lineal en (**g**). **h** Prueba de Mann-Whitney de dos caras, ***p* = 0.0045; **i** Prueba *t* de dos caras no apareada, **p* = 0,0229). Los datos de origen se facilitan como archivo de datos de origen.

Dnm1^{+/R237W}. Cuando se examinó el efecto del BMS-204352 sobre la endocitosis de SV en cultivos primarios de neuronas *Dnm1*^{+/R237W}, se observó de nuevo una corrección completa de la cinética de endocitosis de SV en comparación con las neuronas *Dnm1*^{+/+} (Fig. 7d, e). El BMS-204352 no tuvo ningún efecto significativo sobre la exocitosis de SV ni en las neuronas *Dnm1*^{+/+} con Dyn1_{R237W}-mCer sobreexpresada, ni en las neuronas *Dnm1*^{+/R237W} (Fig. 7c, f). Por lo tanto, el BMS-204352 restaura la endocitosis de SV que previamente se había vuelto disfuncional a través del alelo mutante R237W *Dnm1*.

A continuación, determinamos si el BMS-204352 podría corregir la disfunción observada de la neurotransmisión excitatoria en ratones *Dnm1*^{+/R237W}, ya que predijimos que los defectos en la actividad del circuito eran el resultado de una endocitosis de SV alterada. Cuando se aplicó a rodajas de hipocampo *Dnm1*^{+/+}, el BMS-204352 no tuvo ningún efecto sobre las amplitudes EPSC evocadas a través de un rango de estímulos (Fig. 8a, b). Sin embargo, el BMS-204352 restauró completamente las amplitudes EPSC evocadas normales en rebanadas *Dnm1*^{+/R237W} a niveles *Dnm1*^{+/+}, a través del mismo rango de intensidades de estímulo (Fig. 8c, d). Por lo tanto, el BMS-204352 puede restaurar la neurotransmisión excitatoria evocada normal en los circuitos *Dnm1*^{+/R237W}.

A continuación examinamos si el BMS-204352 podía revertir los cambios plásticos a corto plazo en la neurotransmisión excitatoria monitorizando la facilitación sináptica evocada a través de un tren AP de 10 Hz (15 s). En los cortes de *Dnm1*^{+/+}, se observó una marcada facilitación (Fig. 8e, f), de acuerdo con estudios previos³⁰. Por el contrario, no se observó ninguna facilitación de la neurotransmisión excitatoria en los cortes *Dnm1*^{+/R237W} (Fig. 8e, f). La aplicación de BMS-204352 a los cortes de hipocampo *Dnm1*^{+/R237W} restauró completamente la facilitación a los niveles *Dnm1*^{+/+} y no tuvo ningún efecto sobre la respuesta *Dnm1*^{+/+} (Fig. 8e, f). Por lo tanto, el BMS-204352 corrige defectos fundamentales en la neurotransmisión excitatoria evocada y la plasticidad a corto plazo en los circuitos *Dnm1*^{+/R237W}.

Por último, determinamos si el BMS-204352 era capaz de corregir el fenotipo de salto mioclónico en ratones *Dnm1*^{+/R237W}. Los ratones *Dnm1*^{+/R237W} y los controles *Dnm1*^{+/+} fueron habituados en un campo abierto durante 30 minutos el día 1. Este protocolo se repitió durante 5 días. Este protocolo se repitió durante 5 días. Los días 2 y 4, se administró a los ratones una dosis de BMS-204352 o un vehículo de control de forma contrabalanceada (Fig. 9a). Los ratones también fueron

monitorizados los días 3 y 5 para examinar el comportamiento basal (Washout, Fig. 9a). Cuando se examinó el comportamiento basal de los ratones *Dnm1*^{+/+} y *Dnm1*^{+/R237W}, se observaron grandes diferencias tanto en el número de saltos mioclónicos como en las ráfagas de saltos (definidas como un tren de al menos dos saltos mioclónicos con menos de 2 s entre saltos consecutivos) (Fig. suplementaria 7a, b). Este fenotipo no se debió a un aumento de la actividad general, ya que no hay cambios significativos en la distancia recorrida por los ratones *Dnm1*^{+/R237W} en comparación con los controles *Dnm1*^{+/+} (Fig. suplementaria 7c).

Durante la fase de prueba, los fenotipos que se observaron durante el lavado se mantuvieron en los ratones *Dnm1*^{+/+} y *Dnm1*^{+/R237W} tratados con vehículo. En concreto, los ratones *Dnm1*^{+/R237W} tratados con vehículo mostraron un aumento significativo del número total de saltos mioclónicos (Fig. 9b) y del número de saltos (Fig. 9c) en comparación con los ratones *Dnm1*^{+/+}. La administración de BMS-204352 a ratones *Dnm1*^{+/+} no tuvo efectos significativos sobre estos parámetros (Fig. 9b, c). Por el contrario, el BMS-204352 corrigió completamente ambos fenotipos de salto en ratones *Dnm1*^{+/R237W} hasta los niveles observados en ratones *Dnm1*^{+/+} (Fig. 9b, c). Es importante destacar que esta corrección no se debió a la depresión de la actividad locomotora, ya que la distancia recorrida no fue significativamente diferente cuando se compararon ratones *Dnm1*^{+/R237W} tratados con o sin BMS-204352 (Fig. suplementaria 7c). Además, el BMS-204352 no tuvo ningún efecto sobre el tiempo de permanencia en el centro del área abierta, lo que indica que la corrección de los fenotipos convulsivos no se debió a los efectos ansiolíticos previamente documentados de la molécula²⁹ (Fig. suplementaria 7d). En resumen, estos resultados sugieren que el BMS-204352 tiene un alto potencial terapéutico en la encefalopatía epiléptica *DNM1*, ya que corrige la disfunción a nivel celular, de circuito y de comportamiento en un modelo preclínico de este trastorno.

Debate

Las mutaciones heterocigotas de *DNM1* son responsables de una nueva forma de encefalopatía epiléptica^{1,2}. Aquí, confirmamos que la mutación *DNM1* patogénica más común, R237W, interrumpe la actividad enzimática de la dinamina-1 y la endocitosis SV. Además, utilizando el ratón *Dnm1*^{+/R237W} revelamos que la endocitosis disfuncional de SV se traduce en

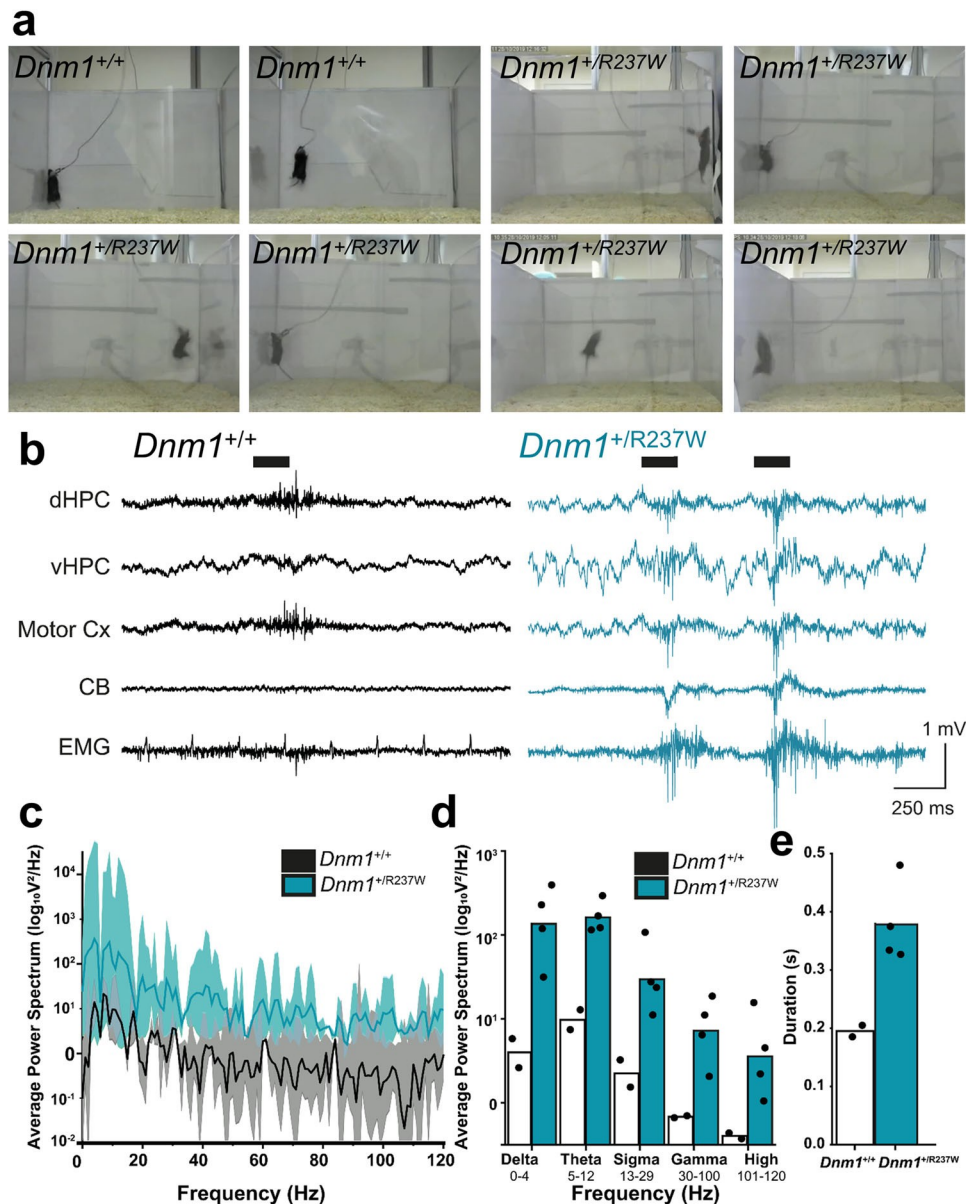


Fig. 6 | Los ratones *Dnm1*^(+/R237W) muestran una actividad similar a las convulsiones mioclónicas saltatorias.

a Imágenes fijas representativas del comportamiento típico de salto de los ratones *Dnm1*^(+/+) y *Dnm1*^(+/R237W). Los ratones *Dnm1*^(+/+) saltaban ocasionalmente, mientras que los ratones *Dnm1*^(+/R237W) mostraban saltos estereotipados y en ráfaga. **b** Ejemplos de registros in vivo de LFP y electromiogramas (EMG) en hipocampo dorsal (dHPC), hipocampo ventral (vHPC), corteza motora (Motor Cx) y cerebelo.

(CB) durante la actividad de salto en ratones *Dnm1*^(+/+) y *Dnm1*^(+/R237W). **c** Estimación del espectro de potencia en todas las épocas de salto. Las líneas indican los valores medios \pm SEM. **d** Gráfico de la potencia media en las bandas de frecuencia más utilizadas durante los saltos. Las barras indican la media de $n=2$ *Dnm1*^(+/+) y $n=4$ *Dnm1*^(+/R237W). **e** Gráfico de la duración media de la actividad electrográfica asociada a los saltos. Las barras indican la media de $n=2$ *Dnm1*^(+/+) y $n=4$ *Dnm1*^(+/R237W). Los datos de origen se proporcionan como archivo de datos de origen.

neurotransmisión excitatoria alterada y, en última instancia, fenotipos de tipo convulsivo. Es importante destacar que estos fenotipos se corrigieron a nivel celular, de circuito e in vivo mediante la aceleración de la endocitosis del SV utilizando BMS-204352. Por lo tanto, este estudio proporciona un vínculo convincente entre la endocitosis disfuncional del SV y la encefalopatía epiléptica, pero además revela que la endocitosis del SV puede ser una vía terapéutica viable para las epilepsias monogénicas intratables.

Se eligió la mutación R237W para nuestro modelo de ratón, ya que es la mutación sin sentido más prevalente en el gen *DNM1* (8 de 33 casos^{1,2}). El ratón *DNM1*^(+/R237W) parece tener validez tanto facial como constructiva y, por lo tanto, se prevé que sea de gran valor para futuros estudios terapéuticos. Estos ratones mostraron un defecto selectivo en la endocitosis del SV, la neurotransmisión excitatoria y un fenotipo de salto característico. Este fenotipo conductual coincidió con un aumento de la actividad generalizada de los picos, lo que demuestra que puede ser un factor de riesgo.

precipitarse a través de eventos de tipo convulsivo. Hemos denominado a este tipo de salto "salto mioclónico", ya que parece similar a los fenotipos de varios modelos preclínicos de epilepsia observados de forma aislada o en progresión hacia convulsiones tónico-clónicas completas³¹⁻³³. Además, también se observa en modelos de autismo / neurodegeneración como medida del comportamiento repetitivo y estereotipado^{34,35}.

Resulta informativo contrastar el ratón *Dnm1*^(+/R237W) con un modelo de ratón caracterizado previamente de encefalopatía epiléptica *DNM1*, el ratón *Fitful*¹⁶. Este ratón no es un modelo de mutación humana, sino que surgió a partir de una mutación espontánea (A408T) en el dominio medio de la isoforma ax de *Dnm1*, y los ratones homocigotos para esta mutación presentan ataques convulsivos espontáneos que provocan la muerte al cabo de 2-3 semanas¹⁶. Los ratones *Fitful* heterocigotos también muestran ataques espontáneos detectables mediante EEG, o episodios convulsivos en la manipulación rutinaria después de 2-3 meses. La mutación A408T

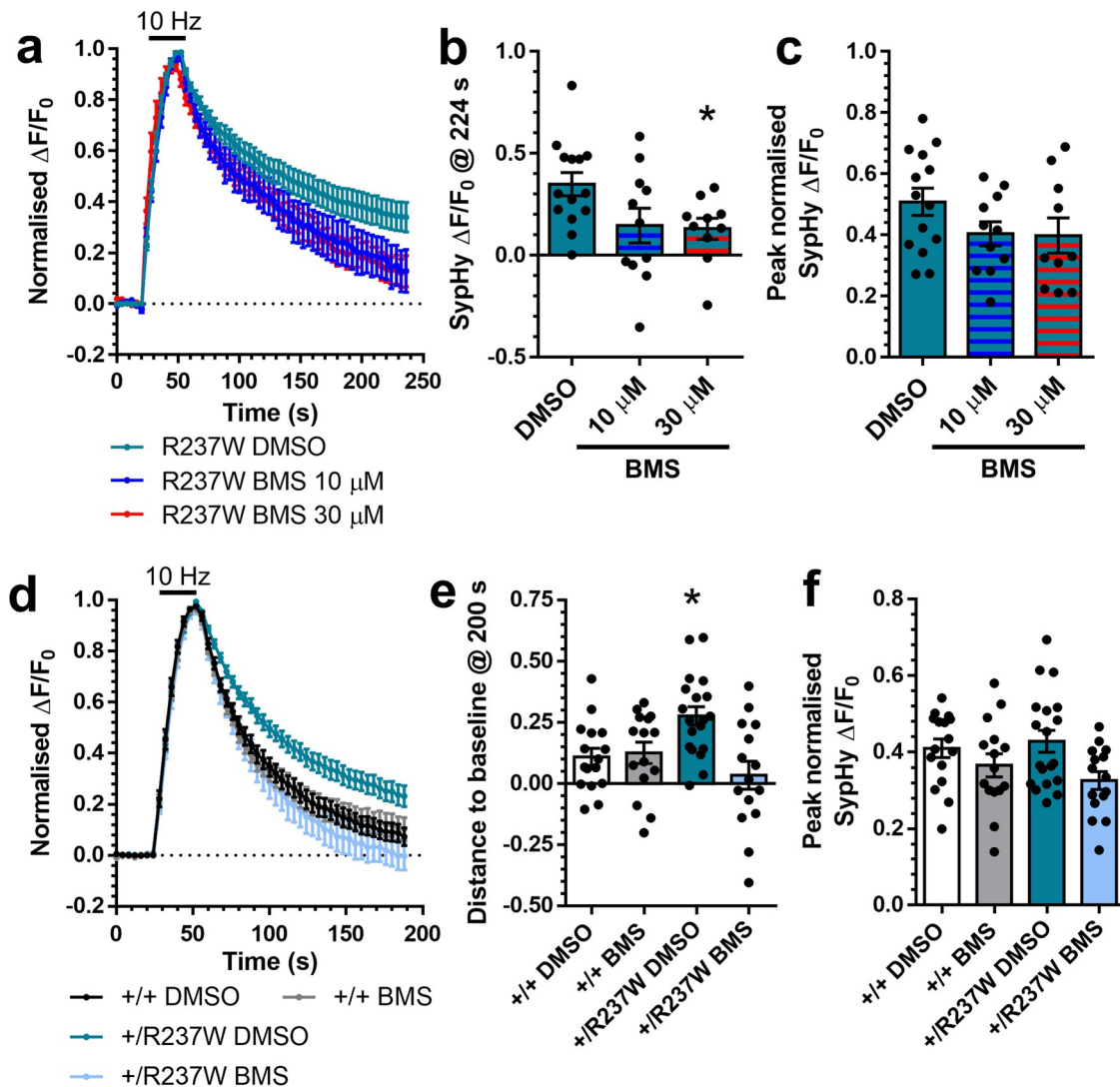


Fig. 7 | BMS-204352 corrige el efecto dominante-negativo de la mutación R237W sobre la endocitosis de SV. **a-c** Cultivos primarios de neuronas del hipocampo preparados a partir de embriones *Dnm1*^{+/+} fueron transfectados con sinaptofisina-pHluorina (syphHy) y Dyn1^{R237W}-mCER entre 11 y 13 DIV. Entre 13 y 15 DIV, los cultivos se estimularon con un tren de 300 potenciales de acción (10 Hz) en presencia de 10 μM o 30 μM de BMS-204352 o un vehículo de control (DMSO). Los cultivos se pulsaron con tampón de imagen NH₄Cl 180 s después de la estimulación. **a** Respuesta media de syphHy ($\Delta F/F_0 \pm$ SEM) normalizada con respecto al pico de estimulación (estimulación indicada por la barra, $n = 14$ DMSO, $n = 11$ 10, $n = 10$ 30, $^*p = 0,0467$ DMSO frente a 30). **b** Nivel medio de fluorescencia syphHy ($\Delta F/F_0 \pm$ SEM) a 224 s (ANOVA unidireccional, $n = 14$ DMSO, $n = 11$ 10, $n = 10$ 30, $^*p = 0,0467$ DMSO frente a 30). **c** Nivel máximo de fluorescencia syphHy ($\Delta F/F_0 \pm$ SEM) normalizado con el desafío NH₄Cl (ANOVA unidireccional, $n = 10$ DMSO, $n = 8-10$, $n = 6$ 30, todos ns). **d-f** primarios de neuronas hipocámpales preparados a partir de embriones *Dnm1*^{+/+} o *Dnm1*^{+/R237W}.

se transfectaron con syphHy entre 7 y 9 DIV. A las 13-15 DIV, se estimularon los cultivos con un tren de 300 potenciales de acción (10 Hz) en presencia de 30 μM de BMS-204352 o de un vehículo de control (DMSO). Los cultivos fueron pulsados con tampón de imagen NH₄Cl 180 s después de la estimulación (estimulación indicada por la barra). **d** Respuesta media de syphHy ($\Delta F/F_0 \pm$ SEM) normalizada con respecto al pico de estimulación ($n = 19$ DMSO *Dnm1*^{+/+}, $n = 15$ BMS *Dnm1*^{+/+}, $n = 16$ DMSO *Dnm1*^{+/R237W}, $n = 15$ BMS *Dnm1*^{+/R237W}). **e** Nivel medio de fluorescencia syphHy ($\Delta F/F_0 \pm$ SEM) a 200 s (ANOVA de una vía, $n = 19$ DMSO *Dnm1*^{+/+}, $n = 15$ BMS *Dnm1*^{+/+}, $n = 16$ DMSO *Dnm1*^{+/R237W}, $n = 15$ BMS *Dnm1*^{+/R237W}, $^*p = 0,0183$ DMSO *Dnm1*^{+/+} vs DMSO *Dnm1*^{+/R237W}). **f** Nivel máximo de fluorescencia syphHy ($\Delta F/F_0 \pm$ SEM) normalizado con respecto al desafío NH₄Cl (ANOVA unidireccional $n = 19$ DMSO *Dnm1*^{+/+}, $n = 15$ BMS *Dnm1*^{+/+}, $n = 16$ DMSO *Dnm1*^{+/R237W}, $n = 15$ BMS *Dnm1*^{+/R237W}, todos los ns). Los datos de origen se facilitan en un archivo de datos de origen.

parece ser responsable de este fenotipo, ya que los ratones *Fitful* homocigotos muestran menos SV en las terminales nerviosas inhibitorias y la sobreexpresión del mutante A408T inhibió la endocitosis mediada por receptores en células COS7³⁶. La ausencia de un efecto dominante-negativo de Dyn1^{A408T}-mCER sobre la endocitosis de SV en nuestro estudio fue, por tanto, sorprendente. Sin embargo, la sobreexpresión de mutantes de dinamina-1 en sistemas de expresión heterólogos (donde la dinamina-2 es la isoforma dominante) puede dar lugar a fenotipos más graves en comparación con la expresión de estos mutantes en su contexto natural. Esto se ve apoyado por el efecto relativamente leve tanto de Dyn1^{R237W}-mCER como de Dyn1^{K44A}-mCER en la endocitosis de SV en nuestro estudio, que contrasta con la ablación de la endocitosis mediada por receptor observada con el mutante K44A en sistemas de expresión heteróloga no neuronales¹³.

Un hallazgo intrigante fue la alteración de la neurotransmisión excitatoria espontánea y evocada en los ratones *Dnm1*^{+/R237W}, sin efectos paralelos sobre la neurotransmisión inhibitoria. La ausencia de efectos sobre la neurotransmisión inhibitoria espontánea o evocada concuerda con estudios previos en el ratón *Fitful* homocigoto (pero véase³⁷), aunque se produce un aumento del rundown durante trenes de AP prolongados con un retraso concomitante en la recuperación de la amplitud del IPSC¹⁶. Este efecto relativamente leve contrasta con los estudios realizados en neuronas *Dnm1*^(-/-), en los que se produjo una gran reducción de los IPSCs evocados en comparación con los EPSCs, y una depresión más rápida y extensa de la neurotransmisión inhibitoria durante los trenes de potenciales de acción³⁸. Además, en las sinapsis *Dnm1*^{3(-/-)}, se observó una fuerte facilitación de la neurotransmisión excitatoria durante la estimulación tanto de baja como de alta frecuencia, con una frecuencia mEPSC, evocada

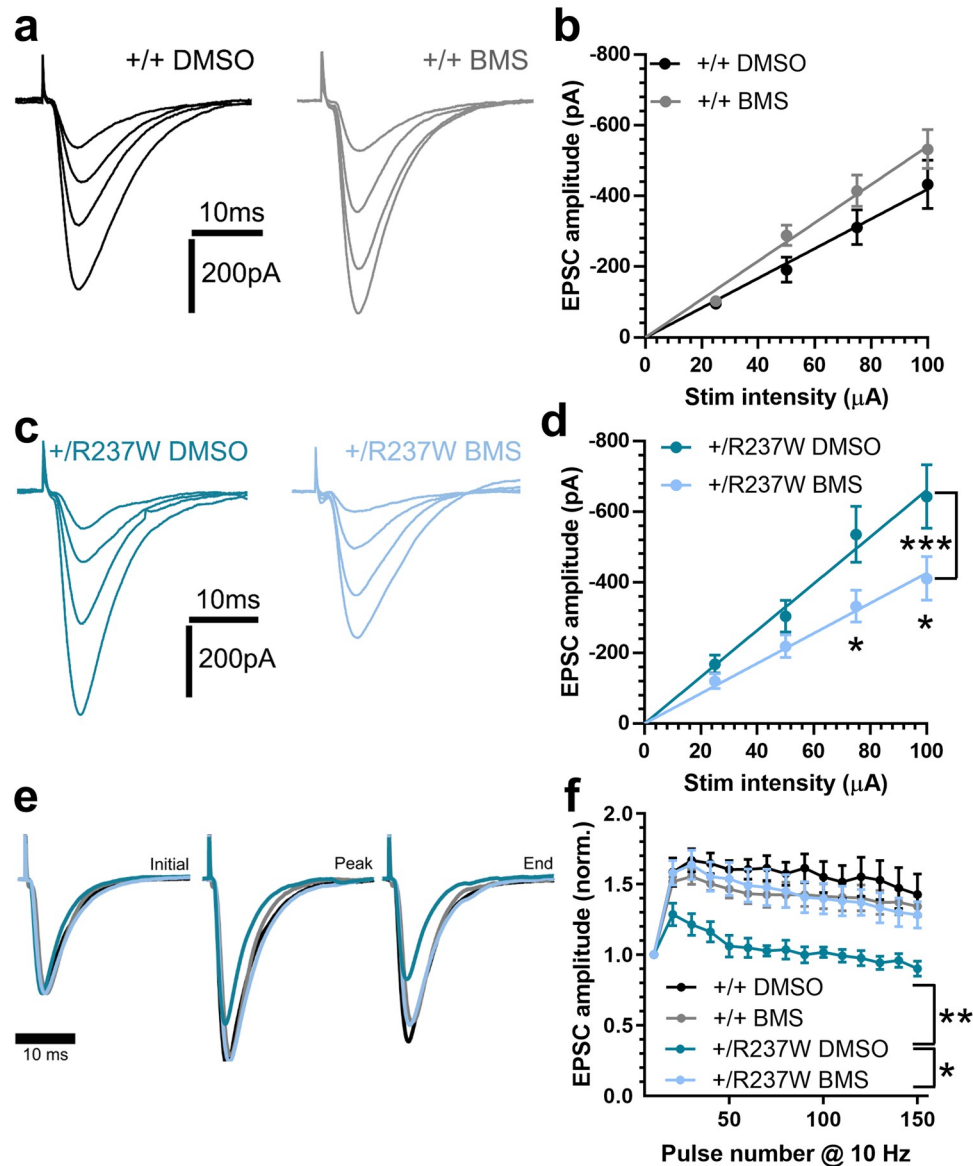


Fig. 8 BMS-204352 corrige los defectos de neurotransmisión en ratones *Dnm1*^{+/R237W}. La neurotransmisión en las sinapsis CA3/CA1 se monitorizó en cortes agudos de hipocampo de ratones *Dnm1*^{+/+} (a, b) o *Dnm1*^{+/R237W} (c, d). Los cortes se estimularon a distintas intensidades (25, 50, 75 y 100 μ A, tres repeticiones a cada intensidad, frecuencia 0,05 Hz) en un orden pseudoaleatorio en presencia de 30 de BMS-204352 o un vehículo de control (DMSO). Se muestran trazos representativos para *Dnm1*^{+/+} (a) o *Dnm1*^{+/R237W} (c, d). Se muestra la amplitud EPSC evocada \pm SEM (ANOVA de dos vías con la prueba de comparación múltiple de Sidak, b $n = 13$ DMSO, $n = 11$ BMS, todos ns;

d $n = 13$ DMSO, $n = 13$ BMS, *** $p = 0,0004$, * $p = 0,04175$, * $p = 0,0145100$). e, f Rebanadas de hipocampo *Dnm1*^{+/+} o *Dnm1*^{+/R237W} estimuladas con un tren de 10 AP (10 Hz), en presencia de 30 μ M BMS-204352 o un vehículo de control (DMSO). e, f Trazos representativos, f Amplitud EPSC evocada para normalizada al primer pulso \pm SEM. ANOVA de dos vías con prueba de comparación múltiple de Dunnett, $n = 5$ DMSO *Dnm1*^{+/+}, $n = 6$ BMS *Dnm1*^{+/+}, $n = 5$ DMSO *Dnm1*^{+/R237W}, $n = 7$ BMS *Dnm1*^{+/R237W}, ** $p = 0,002$ DMSO *Dnm1*^{+/+} vs DMSO *Dnm1*^{+/R237W}, * $p = 0,013$ DMSO *Dnm1*^{+/R237W} vs BMS *Dnm1*^{+/R237W}. Los datos de origen se facilitan en un archivo de datos de origen.

La amplitud de las EPSC, el tamaño del RRP y la Pr disminuyeron³⁹. Las sinapsis *Dnm1*^{+/R237W} también muestran una frecuencia mEPSC reducida y un RRP disminuido, sin embargo, en contraste, observamos un aumento tanto en Pr como en EPSCs evocadas además de una ausencia de STP durante los trenes de potenciales de acción. Además, observamos una disminución de la Pr en las sinapsis inhibitorias *Dnm1*^{+/R237W}. Por lo tanto, incluso cuando la endocitosis de SV se interrumpe en un grado similar entre las neuronas *Dnm1*^{+/R237W} y *Dnm1*^{-/-}, la mutación dominante-negativa R237W ejerce efectos discretos sobre la actividad del circuito que no se observan en los modelos de pérdida de la función de la dinamina-1. Nuestra observación del aumento de Pr en las sinapsis excitatorias con una disminución concomitante de Pr en las sinapsis inhibitorias, por lo tanto, proporciona un microambiente potencial para la epi-leptogénesis, por lo que es fundamental para futuros estudios determinar cómo las neuronas *Dnm1*^{+/R237W} modifican las propiedades del circuito cerebral y las funciones de orden superior.

Observamos una corrección completa de los fenotipos celulares, de circuito e in vivo mediante la administración de BMS-204352. El BMS-204352 se desarrolló agonista de los canales BK para el tratamiento del iclus⁴⁰, pero en los ensayos de fase III no logró mostrar una eficacia superior a la del placebo²⁵. No obstante, el fármaco mostró un excelente perfil de seguridad, lo que lo identificó como un candidato idóneo para estudios de reutilización. Dado que el BMS-204352 ejerce efectos moduladores tanto positivos como negativos sobre varios subtipos de canales de potasio^{28,29}, empleamos una serie de abridores y bloqueantes de canales para dilucidar su mecanismo de acción. Curiosamente, ningún fármaco de esta paleta de moduladores recapituló su actividad modificadora observada sobre la endocitosis de SV. Por lo tanto, el BMS-204352 puede tener efectos adicionales fuera del objetivo responsables de la inversión de los fenotipos en el ratón *Dnm1*^{+/R237W}. Esta cuestión está investigando activamente.

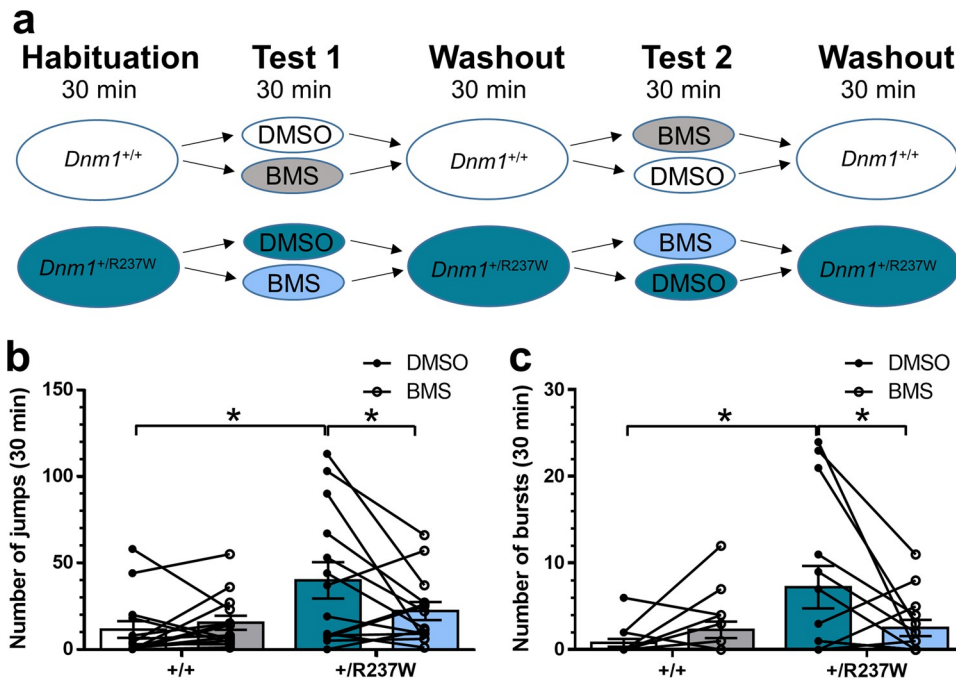


Fig. 9 | El BMS-204352 corrige los eventos de tipo convulsivo en ratones *Dnm1*^{+/R237W}. Los ratones *Dnm1*^{+/+} y *Dnm1*^{+/R237W} fueron colocados en una cámara de campo abierto durante un período de 30 minutos durante 5 días. Tras la habituación en el día 1, se administró a los ratones una dosis de BMS-204352 o un vehículo de control (DMSO) en los días 2 y 4, con lavado de fármaco en los días 3 y 5. La administración del tratamiento farmacológico se intercaló con la administración del fármaco a los ratones *Dnm1*^{+/+}. La administración del tratamiento farmacológico se intercaló entre los días 2 y 4. **a** Esquema del protocolo experimental. Número medio de saltos mioclónicos ± SEM (**b**) o estallidos ± SEM (**c**).

b Modelo lineal general (medidas repetidas) con comparaciones múltiples de Bonferroni $n = 14$ para todos, $*p = 0.019$ DMSO *Dnm1*^{+/R237W} vs BMS *Dnm1*^{+/R237W}, $*p = 0.021$ DMSO *Dnm1*^{+/+} vs DMSO *Dnm1*^{+/R237W}, todos los demás ns (**c**) Modelo lineal general (repetidas) con comparaciones múltiples de Bonferroni $n = 14$ para todos, $*p = 0.016$ DMSO *Dnm1*^{+/+} vs DMSO *Dnm1*^{+/R237W}, $*p = 0.011$ DMSO *Dnm1*^{+/R237W} vs BMS *Dnm1*^{+/R237W} todos los demás ns. Los datos de origen se facilitan como archivo de datos de origen.

El hecho de que el BMS-204352 acelere la endocitosis del SV y corrija los fenotipos celulares, de circuito y de comportamiento en el ratón *Dnm1*^{+/R237W}, proporciona pruebas sólidas de una relación causal directa entre la endocitosis disfuncional del SV y estos resultados. Sin embargo, son posibles otras interrelaciones, ya que el alelo R237W debería perturbar cualquier modo de endocitosis dependiente de dinamina en la sinapsis. Por ejemplo, el tráfico alterado de canales iónicos dependientes de voltaje y de receptores pre o postsinápticos también puede contribuir a los fenotipos observados. Las sinapsis excitatorias *Dnm1*^{+/R237W} no muestran alteraciones significativas en la excitabilidad en términos de umbral de potencial de acción, lo que sugiere una ausencia de la hiperexcitabilidad intrínseca observada en otros modelos de NDDs²⁶. Sin embargo, se observó un ensanchamiento del potencial de acción y una disminución de la tasa de decaimiento del potencial de acción, lo que puede contribuir al aumento de los EPSC evocados. Curiosamente, los canales BK desempeñan un papel clave en el modelado de la forma del potencial de acción⁴¹. Sin embargo, el BMS-204352 no actúa a través de este mecanismo para corregir la función, ya que el ensanchamiento observado refleja una función reducida de los canales BK, en lugar de una función mejorada. También se observa un aumento en la amplitud del mIPSC, similar al ratón *Dnm1*^{-/-}³⁸. Esto puede reflejar un reclutamiento compensatorio de receptores GABA_A postsinápticos para compensar el aumento de la excitabilidad. Por el contrario, puede ser consecuencia de un aumento de la liberación cuantálica, debido a la formación de SV más grandes a través de una endocitosis disfuncional¹⁶. Sin embargo, la amplitud mEPSC inalterada en las neuronas CA1 *Dnm1*^{+/R237W} sugiere que el varamiento postsináptico de receptores AMPA no contribuye al aumento de la respuesta EPSC evocada. Una explicación potencial para el aumento de EPSCs evocados es la recuperación desregulada de receptores presinápticos moduladores. Algunos de ellos tienen efectos directos sobre Pr, a través de la regulación de canales iónicos o cascadas de señalización^{42,43}. Como prueba de ello, hemos observado una regulación al alza de las moléculas de señalización ErbB (que tienen efectos directos sobre la función sináptica⁴⁴) en los sinaptosomas *Dnm1*^{+/R237W} y una disminución concomitante de las moléculas de señalización de los receptores metabotrópicos. Será determinar cuáles de estas cascadas de señalización contribuyen directamente a

aumento del Pr excitatorio y disminución del Pr inhibitorio, y que son cambios compensatorios que se ajustan a la hiperexcitabilidad del circuito.

Por lo tanto, el BMS-204352 es un compuesto prometedor para futuros ensayos en la encefalopatía epiléptica *DNM1*. También existe la posibilidad de que su uso vaya más allá de esta afección específica, ya que se prevé que una cohorte de trastornos monogénicos del neurodesarrollo presenten en su núcleo defectos de la endocitosis del SV. Por ejemplo, en personas con discapacidad intelectual, autismo y epilepsia²⁴ se han identificado una serie de mutaciones con cambio de marco, sin sentido y sin sentido en genes esenciales de endocitosis del SV y de agrupación de la carga del SV, como la proteína de cubierta clatrina⁴⁵, complejos de proteínas adaptadoras⁴⁶, proteínas de recuperación de la carga del SV^{47,48} y reguladores de la endocitosis como TBC1D24^{50,51}. Además, recientemente se ha descubierto que las neuronas derivadas de modelos preclínicos de afecciones monogénicas prevalentes como el síndrome X frágil y el trastorno por deficiencia de CDKL5 muestran defectos en la recuperación de SV^{18,52}. Dado que la endocitosis disfuncional de SV se perfila como un punto de convergencia clave en estas afecciones monogénicas, la regulación de la endocitosis de SV a través del BMS-204352 puede proporcionar un tratamiento potencial para restaurar los mecanismos esenciales de reciclaje y la función normal.

En conclusión, tenemos defectos celulares, de circuito y de comportamiento clave en un modelo de ratón de encefalopatía epiléptica *DNM1*, que proporcionan información importante sobre el locus molecular de la actividad convulsiva. Además, un agente que acelera la endocitosis de SV corrige todos estos defectos, lo que sugiere que la intervención a través de esta vía de tráfico es una vía terapéutica prometedora.

Métodos

Materiales

Salvo que se especifique lo contrario, todos los reactivos de cultivo celular se obtuvieron de Invitrogen (Paisley, Reino Unido). El suero bovino fetal procedía de Biosera (Nuaille, Francia). La papaina se obtuvo de Worthington Biochemical (Lakewood, NJ, EE.UU.). El gluconato de cesio, la tetrodotoxina (TTX) y la picrotoxina procedían de Hello Bio (Bristol, Reino Unido). El Na₂GTP procedía de

Scientific Laboratory Supplies (Newhouse, Reino Unido), mientras que la Na₂-creatina procedía de (Merck, Londres, Reino Unido). El BMS-204352 procedía de Bio-Techne Ltd (Abingdon, Reino Unido). Todos los demás reactivos se obtuvieron de Sigma- Aldrich (Poole, Reino Unido) a menos que se especifique lo contrario. La sinaptofisina-pHluorina (syHy) fue proporcionada por el Prof. L. Lagnado (Universidad de Sussex, Reino Unido). La dinamina-1aa de rata fusionada a mCerulean en su C-terminal⁵³ se sometió a mutagénesis dirigida al sitio para generar tanto R237W (cebador directo [ATTGGCGTGGTGAAGTGGAGCCAGAAGGACATA](#), cebador inverso [TATGTCTTCTGGCTCCAGTTCACACGCCAAT](#)) y las mutaciones K44A (cebador directo [GGCCAGAGCGCCGGCGCGCTCGGTGCTGGAC](#), cebador inverso [CTCCAGCACCGAGCGCGCGCTGGCC](#)).

Los cambios de base fueron confirmados por Source Bioscience Sanger Sequen- cing (Glasgow, Reino Unido).

Generación de ratones *Dnm1*^{+/R237W}

El ratón *Dnm1*^{+/R237W} fue generado por Horizon Discovery (St. Louis, EE.UU.). Brevemente, el codón que codifica R237 dentro del gen *Dnm1* se seleccionó mediante tecnologías CRISPR-Cas9 en una base genética C57Bl/6J utilizando la secuencia guía [cgtggtgaaccggagccagaagg](#). El resultado fue la modificación de la secuencia del gen *Dnm1* de CGGAGC (aminoácidos equivalentes 237/238-RS) a TGGTCT (aminoácidos 237/ 238-WS). En total, se examinaron 44 animales para detectar la mutación puntual, y 4 resultaron positivos. Dos fundadores se retrocruzaron con ratones *Dnm1*^{+/+} para generar progenie F1 heterocigota. La progenie F1 de una de las líneas fundadoras se utilizó para establecer la colonia. Los ratones se mantuvieron como heterocigotos cruzando ratones *Dnm1*^{+/R237W} con ratones C57Bl/ 6J *Dnm1*^{+/+}, con tres retrocruzamientos cada cinco generaciones. Transnetyx (Cordova, TN, EE.UU.) se encargó de la tipificación genética. Se utilizó una colonia interna separada de ratones C57Bl/6J *Dnm1*^{+/+} como fuente de tejido para los cultivos de hipocampo en experimentos en los que se sobreexpresaron las var- ianzas de la dinamina-1.

El trabajo con animales se llevó a cabo de acuerdo con la Ley de Procedimientos Científicos con Animales del Reino Unido de 1986, bajo la autoridad de licencias personales y de proyecto, y fue aprobado por el Órgano de Revisión Ética y Bienestar Animal de la Universidad de Edimburgo (licencias de proyecto del Ministerio del Interior - 7008878 y PP5745138 para el Prof. Cousin y PP1538548 para el Dr. Gonzalez-Sulser). En concreto, todos los animales fueron sacrificados mediante procedimientos de la Lista 1 de acuerdo con las directrices del Ministerio del Interior del Reino Unido; los adultos fueron sacrificados por dislocación cervical o exposición a CO₂ seguida de decapitación, mientras que los embriones fueron sacrificados por decapitación seguida de destrucción del cerebro. La colonia interna de ratones C57Bl/6J *Dnm1*^{+/+} y la colonia de ratones *Dnm1*^{+/R237W} se alojaron en jaulas estándar con un ciclo de luz/oscuridad de 14/10 h (luz de 7 a 21 h). Los reproductores se alimentaron con pienso RM1, mientras que los ratones de reserva se alimentaron con pienso RM3. La temperatura ambiente oscilaba entre 19 y 23 °C con una humedad del 55 ± 10%.

Cultivo celular y transfecciones

Los ratones heterocigotos *Dnm1*^{+/R237W} se aparearon con ratones *Dnm1*^{+/+} para producir crías *Dnm1*^{+/+} o *Dnm1*^{+/R237W}. Los hipocampos de cada embrión se procesaron por separado para evitar la contaminación entre genotipos. Se prepararon cultivos primarios disociados de hipocampo a partir de embriones como se ha descrito previamente¹⁸. Brevemente, los hipocampos aislados se digirieron en una solución de papaína de 10 U/mL (Worthington Biochemical, LK003178) a 37 °C durante 20 minutos. A continuación, la papaína se neutralizó con DMEM F12 (ThermoFisher Scientific, 21331-020) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (BioSera, S1810-500) y un 1% de penicilina/estrep- tomicina (ThermoFisher Scientific, 15140-122). Las células se trituraron para formar una suspensión unicelular y se colocaron a razón de 5 × 10⁴ células por cubreobjetos sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm recubiertos de laminina (10 µg/mL; Sigma Aldrich, L2020) y poli-D-lisina (Sigma Aldrich, P7886) (VWR International Ltd, Lutterworth, Reino Unido). Los cultivos se mantuvieron en medio Neurobasal (ThermoFisher Scientific, 21103-049) suplementado con un 2% de B-27 (ThermoFisher Scientific, 17504-044), 0,5 mM de L-glutamina (Thermo- Fisher Scientific, 25030-024) y un 1% de penicilina/estrep- tomicina. Después de

2-3 días in vitro (DIV), se añadió 1 µM de arabinofuranosido de citosina (Sigma Aldrich, C1768) a cada pocillo para inhibir la proliferación glial. Las neuronas del hipocampo se transfectaron con sinaptofisina-pHluorina (syHy) y/o Dyn1-mCer utilizando Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific, 11668027) según las instrucciones del fabricante y se tomaron imágenes a los 13-15 DIV.

Imagen del reciclaje de SV mediante syHy

La imagen del reciclaje de SV se monitorizó utilizando syHy como se ha descrito previamente¹⁸. Los cultivos de hipocampo transfectados con syHy se montaron en una cámara de formación de imágenes de Warner Instruments (Hamden, CT, EE.UU.) con cables de platino paralelos incrustados (RC-21BRFS) y se montaron en un microscopio de epifluorescencia invertido Zeiss Axio Observer D1 (Cambridge, Reino Unido). Las neuronas se sometieron a estimulación de campo con un estimulador Digitimer LTD MultiStim system-D330 (salida de corriente 100 mA, ancho de corriente 1 ms) a 10 Hz durante 30 s o 40 Hz durante 10 s. Las neuronas se visualizaron con excitación de paso de banda de 500 nm con un filtro dicróico de 515 nm y un filtro de emisión de paso largo >520 nm, y las imágenes se capturaron con una cámara AxioCam 506 mono (Zeiss) con un objetivo de inmersión en aceite Zeiss EC Plan Neofluar 40×/1,30. La adquisición de imágenes se controló con el software Zen Pro. La adquisición de imágenes se controló mediante el software Zen Pro (Zeiss). Los cursos temporales de formación de imágenes se adquirieron a intervalos de 4 s mientras se sometían a perfusión constante con tampón de formación de imágenes (119 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 25 mM HEPES, 30 mM glucosa a pH 7.4, complementado con 10 µM de 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, Abcam, Cambridge, Reino Unido, ab120271) y 50 µM ácido DL-2-amino-5-fosfonopentanoico (AP5, Abcam, Cambridge, Reino Unido, ab120044). Se utilizó tampón alcalino (50 mM NH₄Cl sustituido por 50 mM NaCl) para revelar la respuesta máxima de pHluorina. La fusión de SV durante la estimulación midió estimulando neuronas transfectadas con syHy (10 Hz, 90 s) en presencia de 1 µM de bafilomicina A1 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor Michigan, EE.UU., 11038). El BMS-204352 y otros moduladores del canal de potasio en tampón de formación de imágenes se perfundieron sobre las neuronas 2 min antes y durante la formación de imágenes hasta la adición del tampón alcalino.

Las trazas temporales se analizaron utilizando la distribución FIJI de Image J (National Institutes of Health). Las imágenes se alinearon utilizando el modelo de cuerpo rígido del plugin StackReg (<https://imagej.net/StackReg>). La fluorescencia terminal nerviosa se midió utilizando el plugin Time Series Analyser (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/time-series.html>). Se colocaron regiones de interés (ROI) de 5 píxeles de diámetro sobre los terminales nerviosos que respondían al estímulo eléctrico. Se calculó una traza de respuesta para cada célula promediando las trazas individuales de cada ROI seleccionada. La inhibición de la endocitosis de SV se calculó como la fluorescencia restante 140 s después de la terminación de la estimulación. No se pudo calcular la constante de tiempo de la endocitosis de SV, ya que las trazas individuales de syHy dentro de cada conjunto de experimentos no se ajustaban a la cinética de primer orden.

Captación de HRP en cultivos de hipocampo

Los cultivos de hipocampo se montaron en la cámara de estimulación RC-21BRFS y se sometieron a 400 potenciales de acción (40 Hz) en presencia de tampón de imagen suplementado con 10 mg/ml de HRP (Sigma Aldrich, P8250). Inmediatamente después de finalizar la estimulación, los cultivos se lavaron en tampón de imagen para eliminar la HRP no internalizada y se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2% (Electron Microscopy Sci- ences, Hatfield, EE.UU., 16019) y PFA al 2% en 0,1 M en tampón fosfato (PB). Tras lavar en PB 0,1 M, la HRP se reveló con 3,3'-diaminobencidina al 0,1% (Fluka Chemical, Gillingham, Reino Unido, 22204001) y peróxido de hidrógeno al 0,2% v/v (Honeywell, Muskegon, EE.UU., 216763) en PB. Tras un nuevo lavado en PB, los cultivos se tiñeron con tetróxido de osmio al 1% (TAAB laboratory and microscopy, Aldermaston, UK, O015/1) durante 30 min. A continuación, se deshidrataron las muestras utilizando una serie de etanol y óxido de polipropileno (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, EE.UU., 20411) y se incrustaron utilizando resina Durcupan (Sigma Aldrich, 44610). Las muestras se seccionaron, se montaron en rejillas y se visualizaron con un microscopio electrónico FEI

Microscopio electrónico de transmisión Tecnai 12 (Oregón, EE.UU.). Estructuras intracelulares de <61 nm de diámetro se designaron arbitrariamente como SV, mientras que las estructuras de mayor tamaño se consideraron endosomas. El área de los endosomas individuales se obtuvo trazando la circunferencia con la herramienta de selección a mano alzada de ImageJ y midiendo el área resultante. Normalmente, se adquirieron 20 campos de visión para un cubreobjetos de células. En los terminales nerviosos que contenían HRP, se calculó el número medio de endosomas y SV marcados con HRP por terminal nervioso para cada cubreobjetos y representa el *n* experimental.

Cuantificación de los perfiles endocíticos

Los ratones *Dnm1^{+/+}* o *Dnm1^{+/R237W}* de dos meses de edad fueron anestesiados de forma terminal mediante una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico. A continuación, se perfundió el ventrículo izquierdo de los ratones con solución amortiguadora de fosfato 0,1 helada, seguida de una solución fijadora compuesta por paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2% en solución amortiguadora de fosfato 0,1 M. Se disecaron los cerebros y se sometieron a pruebas de postinfección. Los cerebros se disecaron y se fijaron posteriormente en la misma solución fijadora durante una noche a 2–4 °C, momento en el que la solución fijadora se sustituyó por tampón fosfato 0,1 M. A continuación, los cerebros se procesaron para microscopía electrónica y se sometieron a un proceso de secado. A continuación, los cerebros se procesaron para microscopía electrónica como se ha descrito anteriormente. Se contaron los endosomas y SV individuales y se normalizaron con respecto al área de la terminal nerviosa. El área de los endosomas y SV individuales se obtuvo ajustando una región de interés sobre cada estructura individual utilizando la herramienta de selección de área redonda de ImageJ y midiendo el área resultante. Las estructuras intracelulares con un área <2922 nm² se designaron arbitrariamente como SV, mientras que las estructuras más grandes se consideraron endosomas.

Inmunocitoquímica

La tinción de inmunofluorescencia y el análisis se realizaron como se ha descrito previamente¹⁸. Brevemente, las neuronas del hipocampo se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el PFA y las células se lavaron 2× 5 min con 50 mM NH₄Cl en PBS. A continuación, las células se lavaron 4× 5 min con PBS. Antes de la tinción, las células se permeabilizaron en albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS-Triton al 1% durante 5 minutos. A continuación, las células se lavaron en PBS antes de bloquearlas en BSA al 1% en PBS a temperatura ambiente durante 1 h. Tras el bloqueo, las células se dejaron incubar en anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante 30–45 min (pollo anti-GFP (Abcam ab13970) 1:500; conejo anti-SV2A (Abcam ab32942) 1:200; cabra anti-dinamina-1 (Santa Cruz sc-6402) 1:200). Tras 4 lavados× 5 min, las células se dejaron incubar en anticuerpo secundario (cabra anti-pollo Alexa-Fluor-488 (Invitrogen A11039) 1:1000; cabra anti-conejo Alexa-Fluor-568 (Invitrogen A21069) 1:1000; burro anti-cabra Alexa-Fluor-647 (Invitrogen A21447) 1:1000) diluido en tampón de bloqueo durante 30–45 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Tras el lavado, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos utilizando el reactivo FluorSave (Millipore). Se adquirieron imágenes de Alexa Fluor 488 y 568 utilizando un sistema de imagen de doble cámara (Zeiss). La señal se filtró mediante un filtro de excitación de doble paso de banda (470/27+ 556/25) con divisor de haz (490 + 575) y filtros de emisión 512/30 y 630/98 (Zeiss) respectivamente. El Alexa Fluor 647 se visualizó con una excitación de 640 nm y un filtro de emisión de paso de banda de 690/50. Para cada imagen analizada, se colocaron ROI sobre la neurona transflectada, una neurona no transflectada y el fondo. Esto permitió medir los niveles de sobreexpresión de mCER-Dyn1 dentro de las neuronas en el mismo cubreobjetos comparando la sobreexpresión con los niveles de expresión normales. La fluorescencia de fondo se restó de todas las señales. Para cada cubreobjetos, se adquirieron 4–6 campos con neuronas transflectadas. La *n* es el número de células transflectadas fotografiadas.

Inmunohistoquímica

Se administró una dosis letal de pentobarbital sódico a ratones machos *Dnm1^{+/+}* o *Dnm1^{+/R237W}* de dos meses de edad y se perfundieron transcardialmente con PBS frío seguido de PFA frío (PFA, 4% en PB 0,1 M). Se extrajeron los cerebros y se fijaron durante 24 h en PFA a 4 °C, se lavaron con

PBS, y se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% / PBS durante 48 h a 4 °C. Los cerebros se embebieron en compuesto de congelación de tejidos y se generaron secciones corales de 50 µm utilizando un micrótopo de congelación. Las secciones finas flotantes libres se permeabilizaron durante 4–5 h en solución de bloqueo (PBS, 10% de suero de caballo, 0,5% de BSA, 0,5% de Triton X-100, 0,2 M de glicina) y luego se recubrieron con el anticuerpo primario NeuN diluido en solución de bloqueo (1:1000; Merck; Cat # MAB377) durante toda la noche a 4 °C. Los cortes se lavaron 4–5 veces en PBS durante 2 h y, a continuación, se incubaron durante 3–4 h con anticuerpo secundario (anticonejo Alexa Fluor 568; 1:1000; Invitrogen; Cat #A10042) y Neuro-Trace Green Fluorescent Nissl Stain (1:2000; Invitrogen; Cat #N21480) a temperatura ambiente. A continuación, los cortes se lavaron 4–5 veces en PBS durante 2 h y se montaron en portaobjetos de vidrio con ProLong Gold Antifade Mountant (Invitrogen; Cat #P36930). Las secciones se visualizaron en un microscopio confocal vertical de barrido láser Leica SP8 con un objetivo ×10/NA 0,45. La función de mosaico del microscopio confocal de barrido láser Leica SP8 se utilizó para obtener imágenes de las secciones. Se utilizó la función de mosaico del software de Leica para adquirir imágenes superpuestas de toda la sección y, a continuación, la función de procesamiento de fusión de imágenes para unir los mosaicos.

Bioquímica de proteínas

Las neuronas del hipocampo cultivadas a partir de *Dnm1^{+/+}* o *Dnm1^{+/R237W}* emparejadas por sexo en DIV 14 se lisaron directamente en tampón de muestra SDS (dodecilsulfato sódico) (67 mM Tris, pH 7,4, 2 mM EGTA, 9,3% glicerol, 12%, azul de bromofenol, 67 mM SDS) y se hirvieron a 95 °C durante 10 min antes de la Western blotting. Se prepararon lisados de cerebro entero a partir de cerebros de ratones *Dnm1^{+/+}* o *Dnm1^{+/R237W}* de 3 y 6 semanas de edad emparejados. Los homogeneizados cerebrales se prepararon en tampón RIPA (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 15% Triton X-100, 0,1% desoxicolato sódico, 0,1% SDS, 140 mM NaCl, y 1 mM PMSF) y se centrifugaron en una ultracentrífuga Beckman-Coulter Optima-Max a 116.444 g durante 40 min a 4 °C. Se determinó la concentración de proteínas a partir de cerebros de ratones *Dnm1^{+/+}* y *Dnm1^{+/R237W}* de 3 y 6 semanas de edad. La concentración de proteínas se determinó mediante un ensayo de Bradford (Applichem, Alemania; A6932) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadió tampón de muestras SDS a los lisados y las muestras se hirvieron durante 10 min antes de cargarlas en SDS-PAGE y transferirlas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C (Goat anti-amphiphysin-1 (Santa Cruz sc-8536) 1:500; rabbit anti-Eps15 (Santa Cruz sc-534) 1:1000; Goat anti-dynamin-1 (Santa Cruz sc-6402) 1:1000; anti-sinaptotagmina-1 de ratón (Abcam ab13259) 1:500; anti-sindapina-1 de conejo (Abcam ab137390) 1:4000; antiendofilina-A1 de cabra (Santa Cruz sc-10874) 1:1000; anti-C-src de conejo (Santa Cruz sc-19) 1:100; antiactina de ratón (Sigma Aldrich A4325) 1:50000). Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente (todos Li-Cor, 1:10000; anti-cabra de burro (IRDye® 680RD, 926-68074); anti-cabra de burro (IRDye® 800CW, 926-32214); anti-conejo de burro (IRDye® 800CW, 926-32213); anti-ratón de burro (IRDye® 800CW, 926-32212); anti-ratón de cabra (IRDye® 680RD, 926-68070). Se tomaron imágenes de las membranas en un sistema de imágenes infrarrojas Odyssey 9120 (LI-COR Biosciences) utilizando el software LI-COR Image Studio Lite (versión 5.2) y se analizaron con Ima-geJ. La densidad integrada de señales se midió en ROI rectangulares de idéntico tamaño alrededor de las bandas de expresión de proteínas.

Espectrometría de masas

Los sinaptosomas se prepararon a partir de ratones machos de dos meses de edad *Dnm1^{+/+}* o *Dnm1^{+/R237W}* como se ha descrito³⁰. Brevemente, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se confirmó su muerte por destrucción del cerebro mediante homogeneización en sacarosa 0,32 M helada, EDTA 5 mM (pH 7,4) después de el cerebelo. El homogeneizado se centrifugó a 950× g durante 10 minutos a 4 °C, momento en el que se guardó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el mismo tampón de sacarosa. La solución de pellets resuspendida se centrifugó a 950× g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante resultante se combinó con el primero. A continuación, el sobrenadante combinado se centrifugó a 20.400× g durante 30 min a 4 °C y se retuvo el pellet (fracción sinaptosomal bruta). Los pellets de sinaptosomas se disolvieron en tampón de lisis de urea (8 M de urea en 50 mM de Tris-Cl y 1% de desoxicolato sódico) y se cuantificaron utilizando

el método BCA. Se utilizaron 20 µg de proteína total para la preparación de muestras proteómicas mediante atrapamiento en suspensión (S-Trap)⁵⁴, tal como recomienda el proveedor (ProtiFi, Huntington NY, EE.UU.). Las muestras se redujeron con 5 mM de Tris (2-carboxietil)fosfina (Pierce) durante 30 min a 37 °C, y posteriormente se alquilaron con 5 mM de IAM (yodoacetamida) durante 30 min a 37 °C en la oscuridad. Después de la acidificación con ácido fórmico, la muestra se limpió y se digirió con tripsina (1:20) como se indica en el protocolo del fabricante utilizando un filtro S-trap durante 2 h a 47 °C y los péptidos digeridos se eluyeron utilizando ácido fórmico al 0,2% y acet onitrilo al 50%: ácido fórmico al 0,2%. Los péptidos digeridos eluidos se secaron en speed vac y se almacenaron a -80 °C.

Los péptidos se reconstituyeron en 30 µl de ácido fórmico al 0,1% y vortex y se inyectaron 5 µl de cada muestra en el espectrómetro de masas. Los péptidos se analizaron mediante nanoflow-LC-MS/MS utilizando un espectrómetro de masas Orbitrap Q-Exactive-HF™ (Thermo Scientific™) acoplado a un Dionex™ Ultimate™ 3000. Las muestras se inyectaron en una trampa de 100 µm ID× 5 mm (Thermo Trap Cartridge 5 mm) y se separaron en una columna nano LC de 75 µm× 50 cm (EASY-Spray™ LC Columns #ES803). Todos los disolventes utilizados eran de grado HPLC o LC-MS (Millipore™). Los péptidos se cargaron durante 5 min a 10 µL/min utilizando 0,1% FA, 2% Acet- onitrilo en Agua. La columna se acondicionó utilizando un 100% de Tampón A (0,1% FA, 3% DMSO en Agua) y la separación se realizó en un gradiente lineal de 0 a 35% de Tampón B (0,1% FA, 3% DMSO, 20% Agua en Acetonitrilo), durante 140 min a 250 nL/min. A continuación, la columna se lavó con un 90% de tampón B durante 5 minutos y se equilibró 10 minutos con un 100% de tampón A como preparación para el siguiente análisis. Se adquirieron barridos MS completos de 350 a 1500 *m/z* con una resolución de 60.000 en *m/z* 200, con AGC objetivo de 3×10^6 y un tiempo de inyección máximo de 50 ms. Los barridos MS/MS se adquirieron en modo HCD con una energía de colisión normalizada de 25 y una resolución de 15.000 utilizando un método Top 20, con un AGC objetivo de 2×10^5 y un tiempo máximo de inyección de 50 ms. El umbral de activación MS/MS se fijó en 5E3 y la exclusión dinámica del precursor adquirido previamente se activó durante 45 s para el DDA. En el modo DIA, el intervalo de barrido fue de 385 a 1015 *m/z*, y los datos MS/MS se adquirieron en ventanas de aislamiento de 24 *m/z* con una resolución de 30.000.

Los péptidos agrupados de todas las muestras se fraccionaron en una columna básica de fase inversa (Gemini C18, tamaño de partícula de 3 µm, poro de 110 Å, diámetro interno de 3 mm, longitud de 250 mm, Phenomenex #00G-4439-Y0) en un sistema LC fuera de línea Dionex Ultimate 3000. Todos los disolventes utilizados eran de grado HPLC (Fluka). Los péptidos se cargaron en la columna durante 1 min a 250 µL/min utilizando 99% de tampón A (20 mM de formiato de amonio, pH= 8) y se eluyeron durante 48 min en un gradiente lineal de 2 a 50% de tampón B (100% de ACN). A continuación se lava la columna con tampón B al 90% durante 5 min y se equilibra durante 5 min para la siguiente inyección. La elución del péptido se monitorizó mediante detección UV a 214 nm. Las fracciones se recogieron cada 45 s desde 2 min hasta 60 min para un total de 12 fracciones. La concatenación no consecutiva de cada 13 fracciones se utilizó para obtener 12 fracciones agrupadas (Fracción agrupada 1: Fracción 1+ 13+ 25+ 37, Fracción agrupada 2: Fracción 2+ 14+ 26+ 38...).

Análisis de datos

Se realizó un análisis cuantitativo sin etiquetas utilizando el conjunto de datos adquiridos en modo DIA. La identificación de péptidos se llevó a cabo utilizando una biblioteca generada a partir de los conjuntos de datos DDA y DIA utilizando Spectronaut™ versión 15.0. La biblioteca se generó mediante el algoritmo Pulsar integrado en Spectronaut utilizando FASTA de *Mus musculus* con un FDR del 1%. El máximo de escisión fallida se fijó en 2 utilizando la enzima Trypsin/P. La carbamidometilación (C) se estableció como modificación fija y la acetilación (término N de la proteína), oxidación (M), desaminación (NQ), se establecieron como modificaciones variables. La biblioteca contenía información espectral de 5906 proteínas en total. El conjunto de datos DIA para WT y HET se buscó utilizando esta biblioteca cuantificada 4237 proteínas en . El análisis estadístico se realizó utilizando el script R y el paquete limma para realizar contrastes. Los datos proteómicos brutos se depositaron en PRIDE (<https://www.ebi.ac.uk/pride/>) como se indica a continuación.

Análisis de datos de espectrometría de masas

El análisis de enriquecimiento de los términos de la ontología génica en las proteínas reguladas al alza y a la baja se realizó con respecto a la base de *Mus musculus* utilizando la Base de Datos de Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado (DAVID). Los análisis de enriquecimiento detallados están disponibles en los Datos complementarios 2. El análisis en red de las proteínas reguladas al alza y a la baja se realizó mediante la herramienta web STRING (v.11.5). El análisis de enriquecimiento de la lista completa de proteínas se llevó a cabo utilizando ShinyGO v0.76.2 para el componente celular y las vías biológicas, seleccionadas por FDR y ordenadas por FoldEnrichment y utilizando la base de datos específica de sinapsis SynGO⁵⁵ contra el fondo "cerebro expresado", estableciendo una rigurosidad media y términos de segundo nivel como etiquetas para la representación del componente celular y términos de niveles superiores como etiquetas para las vías biológicas. Representación de rutas (Fig. suplementaria 3).

Ensayos de GTPasas

Se utilizó un ensayo colorimétrico para cuantificar la actividad GTPasa de los distintos mutantes mCer-Dyn1⁵⁶. Las células HEK293T transfectadas con plásmidos mCer-Dyn1 se cosecharon 48 h después de la transfección con una proporción 1:1 de Lipofectamine2000 y plásmido. Las células se resuspendieron en 1 ml tampón de lisis de sacarosa (250 mM de sacarosa, 3 mM de imidazol, pH 7,4, suplementado con 2 µl/ml de inhibidores de proteasa y 1 mM de fluoruro de fenilmetano sulfonilo) y se rompieron mecánicamente utilizando un rompedor de células con bola cebada (EMBL, Heidelberg, Alemania). Para la inmunoprecipitación de mCer, mCer-Dyn1WT o mCer-Dyn1 mutante se utilizó VHH anti-GFP acoplado a perlas de agarosa para inmunoprecipitación de proteínas de fusión GFP (GFP- Trap; ChromoTek GmbH, Alemania; gta-20) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó un ensayo de Bradford (Applichem, Alemania; A6932) según las instrucciones del fabricante para determinar la concentración de proteína de mCer unida a GFP-Trap o mCer-Dyn1. Los mutantes mCer-Dyn1 unidos a GFP-Trap se diluyeron hasta una concentración de 1 µM en tampón de ensayo de GTPasa (20 mM HEPES pH 7,5, 50 mM KCl-esta baja concentración de sal permite la oligomerización de dynamin⁵⁷, 2 mM MgCl₂). Para cada reacción, se incubaron 20 µl de GTP 2 mM diluido en tampón de ensayo de GTPasas y 20 µl de 1 µM stock de mCer-Dyn1 durante 30 min a 37 °C, tras lo cual se añadió 0,5 M EDTA pH 8,0 para terminar la reacción. A cada se añadieron 300 µl de solución verde de malaquita filtrada (34 mg de base de carbinol verde de malaquita disueltos en 40 ml de HCl 1 añadidos a 1 g de tetrahidrato de molibdato de amonio diluido en 14 mL de HCl 4 N hasta 100 mL con ddH₂O). El cambio de color del verde de malaquita se cuantificó utilizando un lector de placas para medir la absorbancia a 650 nm. La cantidad de fosfato inorgánico liberado se calculó utilizando la curva estándar.

Preparación de cortes agudos

Se prepararon cortes horizontales de hipocampo (350 µm) de ratones *Dnm1^{flR237W}* y *Dnm1^(+/+)* de control (P19-25 de ambos sexos). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y la muerte se confirmó mediante la extracción del cerebro. Los cerebros extirpados se transfirieron a líquido cefalorraquídeo artificial carbogenado y modificado con sacarosa (saCSF en mM: NaCl 86, NaH₂PO₄ 1,2, KCl 2,5, NaHCO₃ 25, glucosa 25, sacarosa 50, CaCl₂ 0,5 y MgCl₂ 7) durante 2 min y posteriormente se rebanaron en la misma solución utilizando un micrótopo vibratorio (Leica VT1200S). Los cortes se dejaron recuperar durante 1 h a 33 °C en aCSF estándar carbogenado que contenía (mM): NaCl 126, KCl 3, NaH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, glucosa 15, CaCl₂ 2, y MgCl₂ 2.

Electrofisiología

Para el registro, los cortes se transfirieron a una cámara de inmersión perfundida continuamente con aCSF estándar (MgCl₂ 1 mM) mantenida a 32 °C mediante un calentador Peltier en línea (Scientifica, Uckfield, Reino Unido). Se realizó un corte entre CA2 y CA1 (identificado como la terminación medial del estrato lúcido) para eliminar la actividad recurrente. Se realizaron grabaciones con patch-clamp de células enteras a partir de neuronas piramidales identificadas visualmente en

la región CA1 utilizando electrodos de borosilicato estirados (4-7 MΩ). La solución intracelular para los experimentos de propiedades evocadas e intrínsecas consistió en (mM): K-gluconato 142, KCl 4, EGTA 0,5, HEPES 10, MgCl₂ 2, Na₂ATP 2, Na₂GTP 0,3, y Na₂-creatina 10. Para las grabaciones de mEPSC, se utilizó una solución intracelular a base de cesio (mM): Cs-gluconato 140, CsCl 3, EGTA 0,2, HEPES 10, cloruro QX-314 5, MgATP 2, NaATP 2, Na₂GTP 0,3 y fosfocreatina 10. Se registraron las corrientes excitatorias en presencia de picrotoxina (50 μM) con las células sometidas a pinzamientos de voltaje a -70 mV, se registraron las corrientes inhibitorias en presencia de CNQX (10 μM) y D-AP5 (50 μM) con las células sujetas por tensión a -10 mV. Se realizó una adición adicional de TTX (300 nM) para el registro de mPSC. Para los experimentos con BMS-204352, el fármaco se disolvió en DMSO y TWEEN® 80 antes de añadirlo al aCSF estándar. La concentración final del fármaco fue de 30, con los vehículos ambos al 0,03% v/v.

Protocolos de registro: Las propiedades intrínsecas se registraron en modo de pinza de corriente. Todos los demás registros se realizaron con pinzas de tensión. Las corrientes se filtraron a 3-10 kHz y se muestrearon a 10-20 kHz, utilizando el software Clampex 10 (pClamp 10, Molecular Devices, San José, EE.UU.). Para los registros evocados, se estimulaban las colaterales de Schaffer con un electrodo de parche (~1-2 MΩ) lleno de aCSF y posicionado en el stratum radiatum, conectado a un estimulador aislado de corriente constante (Digitimer, Welwyn Garden City, Reino Unido). En todos los , la intensidad del estímulo se ajustó para evocar una corriente de ~200 pA tras un pulso de 50 μs. El estímulo se administró con pulsos emparejados (intervalo de 10-500 ms, pares con 30 s de intervalo) o trenes largos (10 o 40 Hz durante 15 s, cuatro repeticiones con 4 min de intervalo). Los datos se analizaron fuera de línea utilizando el paquete de software de código abierto Stimfit (propiedades intrínsecas) o Clampfit del paquete de software pClamp 10 (todas las EPSC). Las células se excluyeron del análisis si la resistencia en serie variaba más de un 20% durante el registro.

El tamaño de la RRP y su reposición se determinaron utilizando los enfoques descritos en la ref. ²³. Brevemente, la RRP se calculó trazando la amplitud EPSC acumulativa de trenes de 40 Hz y 15 s, y realizando una regresión lineal en el último 1 s de dicho trazado. La intersección y de esta línea de regresión denota el tamaño RRP (Fig. 5g). La tasa de reposición está representada por la pendiente de la línea de regresión. Pr se calculó como la amplitud de la primera EPSC evocada dividida por el tamaño efectivo de la RRP²⁶. Para la cuantificación de la PPR IPSC, la amplitud de la segunda respuesta se midió a partir del punto más bajo inmediatamente después de el segundo artefacto de estimulación. Esto se debió a que la cinética de decaimiento típica de las respuestas inhibitorias significaba que la respuesta no había

volvió a la línea de base antes del inicio del segundo estímulo.

Cirugía para electrofisiología in vivo

Los ratones *Dnm1^{+/R237W}* y *Dnm1^{+/+}* de ambos sexos de 8 semanas de edad fueron anestesiados con isoflurano y montados en un bastidor este-reotático (David Kopf Instruments, EE.UU.). Se implantaron pares de electrodos LFP locales (Ø= 50,8 μm, acero inoxidable aislado con teflón, A-M Systems, EE.UU.) dirigidos al hipocampo dorsal bilateralmente (1,85 mm caudal, 1,25 mm lateral desde el bregma y 1,40 mm ventral desde la superficie cerebral), hipocampo ventral bilateralmente (3,3 mm caudal, 3,3 mm lateral desde bregma y 2,9 mm ventral desde la superficie cerebral), corteza motora izquierda (1,55 mm caudal, 1,88 mm izquierda desde bregma y en la superficie cerebral), corteza somatosensorial derecha (1,3 mm caudal, 2,0 mm lateral desde bregma y en la superficie cerebral) y el cerebelo de la línea media (5,7 mm caudal, 0 mm lateral desde bregma y en la superficie cerebral). Se fijaron dos tornillos esmerilados en miniatura (Yahata Neji, M1 Pan Head Stainless Steel Cross, RS Components, Northants, Reino Unido) sobre el cerebelo (5,0 mm caudal, 2 mm lateral) para servir de esmerilado, así como tres tornillos adicionales para soporte estructural. Los electrodos se fijaron a una placa de interfaz electrónica (EIB-16, Neuralynx, EE.UU.). Los conjuntos de electrodos se fijaron al cráneo utilizando una combinación de cemento activado por UV (3M Relyx Unicem 2 Automix, Henry Schein, Gillingham, Reino Unido) y cemento dental (Simplex Rapid, Kemdent, Swindon, Reino Unido).

Grabaciones in vivo de LFP

Los ratones se colocaron en arenas cuadradas de 50× 50 cm y se conectaron para los registros a un cabezal de grabación RHD de 16 canales (Intantech, EE.UU.) a través de un conmutador eléctrico (Adafruit, EE.UU.) y una placa de adquisición (Open Ephys, EE.UU.). Las señales LFP se muestrearon a 1 kHz y se referenciaron a tierra mediante la interfaz gráfica de usuario OpenEphys (Open Ephys, EE.UU.). Los ratones se grabaron en vídeo durante las sesiones de estimulación a 9,98 fotogramas por segundo (webcam C270 HD, Logitech, EE.UU.). Un pulso de luz de 1 s de un LED azul (azul= 465 nm, Plexon, EE.UU.) montado en cada conmutador se activó mediante un Master-8 (AMPI) cada cinco minutos para sincronizar las marcas de tiempo de salto en las grabaciones de vídeo y LFP.

Análisis de grabaciones de LFP in vivo

Las marcas de tiempo de los saltos se identificaron mediante análisis visual de vídeos simultáneos en grabaciones de 1 hora. Se analizaron entre 2 y 8 saltos por animal y se promediaron los valores por ratón. Se calculó el espectro de potencia, con una ventana Hann no solapada de 1 s, del hipocampo dorsal durante 1 s tras el inicio de un salto, utilizando la función Periodogram de SciPy Python. La duración de la actividad electrofisiológica se midió manualmente trazando los datos con la función plot del paquete MNE Python.

Experimentos de comportamiento

Para el ensayo de campo abierto, se colocó a controles de 6 a 8 semanas de edad *Dnm1^{+/R237W}* y *Dnm1^{+/+}* iluminados de ambos sexos en un campo abierto de 50 cm× 50 cm durante 30 minutos durante 5 días consecutivos. El primer día en la arena sirvió de habituación. Los días 2 (prueba 1) y 4 (prueba 2) los ratones recibieron 2 mg/kg de BMS-204352 o vehículo (DMSO 1/80; Tween 80 1/80; NaCl al 0,9%) administrado por inyección intraperitoneal (como se describe en la ref. ²⁶) de forma contrabalanceada como se describe en la Fig. 9a. No se administraron inyecciones los días 3 y 5 (lavado). Las inyecciones se administraron 20 minutos antes del inicio del experimento para asegurar la máxima concentración cerebral de BMS-204352 durante el tiempo en campo abierto. La actividad se grabó a 9,89 fps tanto desde la vista superior como desde la vista lateral de la arena utilizando cámaras Logitech (webcam C270 HD, Logitech) con hasta cuatro animales grabados simultáneamente en arenas individuales. El comportamiento de salto se puntuó con el programa informático Behavioral Observation Research Interactive Software (BORIS v.7.9.24, Universidad de Turín⁵⁹), que permitía registrar cada salto en el tiempo.

Análisis del movimiento y la posición de los ratones en tareas de comportamiento Se utilizó DeepLabCut (DLC v.2.1.10.4) para comparar el movimiento y la posición de los ratones⁶⁰. Se utilizó la base de la cola para el análisis, ya que proporcionaba la aproximación más exacta del movimiento y la posición en dos dimensiones. El DLC siguió el movimiento del animal durante la duración de cada vídeo y proporcionó una salida para sus coordenadas X e Y en cada fotograma. Se utilizó un bucle para iterar las coordenadas predichas de la base de la cola en cada vídeo y calcular la distancia recorrida por el animal en cada fotograma. Estas distancias se sumaron en todos los fotogramas para determinar la distancia total recorrida en el experimento de 30 minutos. A continuación, los vídeos se agruparon en función del ángulo de la cámara. Para cada ángulo, se utilizó el DLC para asignar coordenadas a las esquinas de la arena del animal, lo que permitió convertir las unidades de DLC en centímetros. Para determinar el tiempo un animal pasaba en el centro y a lo largo de las paredes de la arena, se utilizaron distintos ángulos de cámara. Para cada ángulo, las dimensiones de la arena del animal se aproximaron para crear una caja "exterior" y una "interior". Cada caja contenía la mitad de la superficie total de la arena. Se totalizó el número de coordenadas de la base de la cola encontradas en ambas cajas (tiempo pasado en el centro), así como las encontradas únicamente en la caja grande (tiempo pasado en los bordes).

Análisis estadístico

En todos los experimentos y análisis de datos, los experimentadores no tuvieron conocimiento del genotipo de los animales ni de las células. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 8.4.3. El análisis estadístico de los

Los datos de comportamiento se analizaron con IBM SPSS Statistics v29. No se utilizaron métodos estadísticos para predeterminar el tamaño de las muestras ni se aplicaron procedimientos de rando- misación. Se aplicaron pruebas estadísticas basadas sobre la distribución de los conjuntos de datos medida mediante la prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson. La significación se fijó en ns $P > 0,05$, $P < 0,05$, $P^{**} < 0,01$,

$P^{***} < 0,001$, $P^{****} < 0,0001$. Mann-Whitney (dos colas), Wilcoxon rango con signo de pares emparejados (dos colas), y Kruskal-Wallis con Dunns para comparar conjuntos de datos no gaussianos. Para comparar conjuntos de datos con distribución normal se utilizó la prueba t de Student (de dos colas) y análisis de varianza seguidos de la prueba post hoc de Dunnett. Se utilizó un modelo lineal general (medidas repetidas) para determinar los efectos del genotipo, los efectos del tratamiento y las interacciones. Se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para las comparaciones multigrupo cuando fue apropiado. La información sobre el tamaño de las muestras, las pruebas estadísticas utilizadas para calcular los valores P y los valores numéricos de los resultados se especifican en las leyendas de las figuras y en la Tabla suplementaria 2.

Resumen de los informes

Encontrará más información sobre el diseño de la investigación en el resumen de informes de Nature Portfolio enlazado a este artículo.

Disponibilidad de datos

Todos los datos pertinentes se incluyen en el artículo y/o en sus archivos de información suplementaria. Los datos de origen se facilitan en este artículo. La única excepción son los datos proteómicos brutos, que están depositados en PRIDE (Project accession: PXD039667; Título del proyecto: Reversión de la célula, circuito y fenotipos convulsivos en un modelo de ratón de encefalopatía epiléptica DNM1; Página web del proyecto: <http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD039667>). Los datos fuente se facilitan con este artículo.

Referencias

- von Spiczak, S. et al. *DNM1* encephalopathy: a new disease of vesicle fission. *Neurology* 89, 385-394 (2017).
- EuroEPINOMICS-RES, Consortium et al. De novo mutations in synaptic transmission genes including *DNM1* cause epileptic encephalopathies. *Am. J. Hum. Genet.* 95, 360-370 (2014).
- Parthasarathy, S. et al. A recurrent de novo splice site variant que afecta al exón 10a de *DNM1* causa encefalopatía epiléptica y del desarrollo a través de un mecanismo dominante-negativo. *Am. J. Hum. Genet.* 109, 2253-2269 (2022).
- Ferguson, S. M. & De Camilli, P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPasa. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 75-88 (2012).
- Antonny, B. et al. Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J.* 35, 2270-2284 (2016).
- Vallis, Y., Wigge, P., Marks, B., Evans, P. R. & McMahon, H. T. Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Biol.* 9, 257-260 (1999).
- Marks, B. et al. GTPase activity of dynamin and resulting con- son esenciales para la endocitosis. *Nature* 410, 231-235 (2001).
- Sever, S., Muhlberg, A. B. & Schmid, S. L. La alteración del dominio GAP de la dinamina estimula la endocitosis mediada por receptor. *Nature* 398, 481-486 (1999).
- Imoto, Y. et al. Dynamin is primed at endocytic sites for ultrafast endocytosis. *Neuron* 110, 2185-2135.e13 (2022).
- Brereton, E. et al. Mutations in the PH domain of *DNM1* are asso- ciated with a non-epileptic phenotype characterized by develop- mental delay and neurobehavioral abnormalities. *Mol. Genet. Genomic Med.* 6, 294-300 (2018).
- Mei, D., Parrini, E., Bianchini, C., Ricci, M.L. & Guerrini, R. Autism and mild epilepsy associated with a de novo missense pathogenic variant in the GTPase effector domain of *DNM1*. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.32044> (2023).
- Chappie, J. S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S. L. & Dyda, F. G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* 465, 435-440 (2010).
- van der Blik, A. M. et al. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* 122, 553-563 (1993).
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S. J. & Lagnado, L. Clathrin- es el mecanismo dominante de recuperación de vesículas en las sinapsis del hipocampo. *Neuron* 51, 773-786 (2006).
- Atluri, P. P. & Ryan, T. A. The kinetics of synaptic vesicle reacidifi- cation at hippocampal nerve terminals. *J. Neurosci.* 26, 2313-2320 (2006).
- Boumil, R. M. et al. A missense mutation in a highly conserved alternate exon of dynamin-1 causes epilepsy in fitful mice. *PLoS Genet.* 6, e1001046 (2010).
- Sankaranarayanan, S. & Ryan, T. A. Calcium accelerates endocy- tosis of vSNAREs at hippocampal synapses. *Nat. Neurosci.* 4, 129-136 (2001).
- Bonnycastle, K., Kind, P. C. & Cousin, M. A. La FMRP sostiene la pre función sináptica mediante el control de la endocitosis dependiente de la actividad. *J. Neurosci.* 42, 1618-1628 (2022).
- Watanabe, S. et al. La clatrina regenera vesículas sinápticas a partir de endosomas. *Nature* 515, 228-233 (2014).
- Kononenko, N. L. et al. Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron* 82, 981-988 (2014).
- Shupliakov, O. et al. Synaptic vesicle endocytosis impaired by dis- ruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* 276, 259-263 (1997).
- Chen, Y. et al. Formation of an endophilin-Ca²⁺ channel complex is critical for clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Cell* 115, 37-48 (2003).
- Schneeggenburger, R., Meyer, A. C. & Neher, E. Fracción liberada y el tamaño total de una reserva de cuantos transmisores inmediatamente disponibles en una sinapsis de cáliz. *Neuron* 23, 399-409 (1999).
- Bonnycastle, K., Davenport, E. C. & Cousin, M. A. Presynaptic dys- function in neurodevelopmental disorders: Insights from the synaptic vesicle life cycle. *J. Neurochem.* 157, 179-207 (2021).
- Jensen, B. S. BMS-204352: un abridor de canales de potasio desarrollado para el tratamiento del ictus. *CNS Drug Rev.* 8, 353-360 (2002).
- Hébert, B. et al. Rescue of fragile X syndrome phenotypes in Fmr1 KO mice by a BKCa channel opener molecule. *Orphanet. J. Rare Dis.* 9, 124 (2014).
- Contractor, A., Klyachko, V. A. & Portera-Cailliau, C. Altered neu- ronal and circuit excitability in fragile X syndrome. *Neuron* 87, 699-715 (2015).
- Laumonier, F. et al. Asociación de un déficit funcional del BKCa un regulador sináptico de la excitabilidad neuronal, con el autismo y el retraso mental. *Am. J. Psychiatry* 163, 1622-1629 (2006).
- Korsgaard, M. P. et al. Anxiolytic effects of Maxipost (BMS-204352) and retigabine via activation of neuronal Kv7 channels. *J. Pharma- col. Exp. Ther.* 314, 282-292 (2005).
- Ivanova, D. et al. Control of synaptic vesicle release probability via VAMP4 targeting to endolysosomes. *Sci. Adv.* 7, eabf3873 (2021).
- Stewart, L. S. et al. Circadian distribution of generalized tonic-clonic seizures associated with murine succinic semialdehyde dehy- drogenase deficiency, a disorder of GABA metabolism. *Epilepsy Behav.* 13, 290-294 (2008).
- Meidenbauer, J. J., Mantis, J. G. & Seyfried, T. N. El ratón EL: un modelo natural de autismo y epilepsia. *Epilepsia* 52, 347-357 (2011).
- Van Erum, J., Van Dam, D. & De Deyn, P. P. Las convulsiones inducidas por PTZ en ratones requieren una escala de Racine revisada. *Epilepsy Behav.* 95, 51-55 (2019).

34. Lalonde, R., Dumont, M., Staufienbiel, M. & Strazielle, C. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behavior. Brain Res.* 157, 91-98 (2005).
35. Lalonde, R. & Strazielle, C. Regiones cerebrales y genes que afectan al mioclonía en animales. *Neurosci. Res.* 74, 69-79 (2012).
36. Dhindsa, R. S. et al. Epileptic encephalopathy-causing mutations in *DNM1* impair synaptic vesicle endocytosis. *Neurol. Genet.* 1, e4 (2015).
37. McCabe, M. P., Shore, A. N., Frankel, W. N. & Weston, M. C. Altered fast synaptic transmission in a mouse model of DNM1-associated developmental epileptic encephalopathy. *eNeuro* 8, ENEURO.0269-20.2020 (2021).
38. Ferguson, S. M. et al. A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science* 316, 570-574 (2007).
39. Lou, X. et al. La probabilidad de liberación reducida previene el agotamiento de vesículas y el fallo de transmisión en sinapsis mutantes de dinamina. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, E515-E523 (2012).
40. Gribkoff, V. K. et al. Targeting acute ischemic stroke with a calcium-abridor sensible de los canales de potasio maxi-K. *Nat. Med.* 7, 471-477 (2001).
41. Roshchin, M. V. et al. Una vía de retroalimentación mediada por el canal BK vincula la actividad de una sola sinapsis con la agudización del potencial de acción en repetitive firing. *Sci. Adv.* 4, eaat1357 (2018).
42. Lin, P. Y., Kavalali, E. T. & Monteggia, L. M. Genetic dissection of presynaptic and postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synaptic efficacy of CA3-CA1 Synapses. *Cell Rep.* 24, 1550-1561 (2018).
43. Lovinger, D. M. et al. La modulación local por receptores presinápticos controla la comunicación neuronal y el comportamiento. *Nat. Rev. Neurosci.* 23, 191-203 (2022).
44. Ledonne, A. & Mercuri, N. B. Sobre las funciones moduladoras de las neuronas-egulins/erbb signaling on synaptic plasticity. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 275 (2019).
45. DeMari, J. et al. *CLTC* as a clinically novel gene associated with multiple malformations and developmental delay. *Am. J. Med. Genet. A* 170a, 958-966 (2016).
46. Helbig, I. et al. A recurrent missense variant in *AP2M1* impairs endocytosis mediada por clatrina y causa encefalopatía epiléptica del desarrollo y . *Am. J. Hum. Genet.* 104, 1060-1072 (2019).
47. Tarpey, P. S. et al. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat. Genet.* 41, 535-543 (2009).
48. Hubert, L. et al. De novo SCAMP5 mutation causes a neurodevelopmental mental con rasgos autistas y convulsiones. *J. Med. Genet.* 57, 138-144 (2020).
49. Serajee, F. J. & Huq, A. M. Homozygous mutation in synaptic vesicle glycoprotein 2A gene results in intractable epilepsy, involuntary movements, microcephaly, and developmental and growth retardation. *Pediatr Neurol.* 52, 642-646.e641 (2015).
50. Corbett, M. A. et al. Una epilepsia focal y discapacidad intelectual se debe a una mutación en *TBC1D24*. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 371-375 (2010).
51. Falace, A. et al. TBC1D24, an ARF6-interacting protein, is mutated in familial infantile myoclonic epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 365-370 (2010).
52. Kontaxi, C., Ivanova, D., Davenport, E. C., Kind, P. C. & Cousin, M. A. La deficiencia de CDKL5 relacionada con la epilepsia ralentiza la endocitosis de vesículas sinápticas en terminales nerviosas centrales. *J. Neurosci.* 43, 2002-2020 (2023).
53. Clayton, E. L. et al. The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J. Neurosci.* 29, 7706-7717 (2009).
54. HaileMariam, M. et al. S-Trap, an ultrafast sample-preparation enfoque para la proteómica de escopeta. *J. Proteome Res.* 17, 2917-2924 (2018).
55. Koopmans, F. et al. SynGO: una base de conocimiento basada en la evidencia y curada por expertos para la sinapsis. *Neuron* 103, 217-234.e214 (2019).
56. Leonard, M., Song, B. D., Ramachandran, R. & Schmid, S. L. Robust colorimetric assays for dynamin's basal and stimulated GTPase activities. *Methods Enzymol.* 404, 490-503 (2005).
57. Warnock, D. E., Hinshaw, J. E. & Schmid, S. L. El autoensamblaje de la dinamina estimula su actividad GTPasa. *J. Biol. Chem.* 271, 22310-22314 (1996).
58. Thanawala, M. S. & Regehr, W. G. La afluencia presináptica de calcio controla la liberación de neurotransmisores en parte regulando el tamaño efectivo de la reserva fácilmente liberable. *J. Neurosci.* 33, 4625-4633 (2013).
59. Friard, O. & Gamba, M. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods Ecol. Evol.* 7, 1325-1330 (2016).
60. Mathis, A. et al. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat. Neurosci.* 21, 1281-1289 (2018).

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por subvenciones concedidas a M.A.C. (Epilepsy Research UK (P2003), Wellcome Trust Investigator Award (204954/Z/16/Z) y RS McDonald Fund) a M.T. (Wellcome Trust Multi-User Equipment grant (212947/Z/18/Z)) y A.G.S. (Epilepsy Research UK (F1603)). Para fines de acceso abierto, el autor ha aplicado una licencia CC-BY de derecho de copia pública a cualquier versión del manuscrito aceptada por el autor que surja de esta presentación. Agradecemos a Stephen Mitchell el procesamiento de las muestras de EM.

Contribuciones de los autores

Conceptualización, K.B., M.A.C.; Metodología, K.B., K.L.D., M.P., M.S., E.B., A.G., E.C.D., M.T., A.G.S.; Análisis formal, K.B., K.L.D., A.G., E.C.D., M.P., M.S., A.G.S.; Investigación, K.B., K.L.D., A.G.S., M.A.C.; Recursos, M.A.C., M.T., A.G.S.; Redacción-borrador original, K.B., M.A.C.; Redacción-revisión y edición, todos los autores; Adquisición de fondos, M.A.C., M.T., A.G.S.

Intereses contrapuestos

Los autores declaran no tener intereses contrapuestos.

Información complementaria

Información complementaria La versión en línea contiene material complementario disponible en <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41035-w>.

La correspondencia y las solicitudes de material deben dirigirse a Katherine Bonnycastle o Michael A. Cousin.

Información sobre la revisión por pares *Nature Communications* agradece a Changhe Wang, Natalí L Chanaday Ricagni y a los demás revisores anónimos su contribución a la revisión por pares de este trabajo. Hay disponible un archivo de revisión por pares.

La información sobre autorizaciones y reimpresiones está disponible en <http://www.nature.com/reprints>

Nota del editor Springer Nature se mantiene neutral con respecto a las reivindicaciones jurídicas en los mapas publicados y las afiliaciones institucionales.



Acceso abierto Este artículo está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional, que permite su uso, compartición, adaptación, distribución y reproducción en cualquier medio o formato, siempre que se cite debidamente al autor o autores originales y la fuente, se facilite un enlace a la licencia Creative Commons y se indique si se han realizado cambios. Las imágenes u otro material de terceros en este artículo están incluidos en la licencia Creative Commons del artículo, a menos que se indique lo contrario en una línea de crédito al material. Si el material no está incluido en la licencia Creative Commons del artículo y su uso previsto no está permitido por la normativa legal o excede el uso permitido, deberá obtener permiso directamente del titular de los derechos de autor. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© Autor(es) 2023