

Tesis Doctoral

# Estudio del rol del transporte axonal en la vía nigroestriatal en ratones knockout condicionales del motor molecular kif5b

Cromberg, Lucas Eneas

2017-04-04

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cromberg, Lucas Eneas. (2017-04-04). Estudio del rol del transporte axonal en la vía nigroestriatal en ratones knockout condicionales del motor molecular kif5b. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Cromberg, Lucas Eneas. "Estudio del rol del transporte axonal en la vía nigroestriatal en ratones knockout condicionales del motor molecular kif5b". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-04-04.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# **Estudio del rol del transporte axonal en la vía nigroestriatal en ratones knockout condicionales del motor molecular kif5b**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área Ciencias Biológicas**

**Lic. Lucas Eneas Cromberg**

**Director de Tesis:** Dr. Tomás L. Falzone

**Consejero de Estudio:** Osvaldo D. Uchitel

**Lugar de trabajo:** Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof. E. De Robertis”, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

**Fecha de Defensa:** 04/04/2017

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2017

**Para Teodoro.**

“La ciencia no tiene Patria,  
El hombre de ciencia si la tiene”  
Bernardo Houssay

# Agradecimientos

Pasó mucho tiempo desde que me decidí por continuar una carrera científica. Terminar esta tesis doctoral no solamente implica terminar un ciclo de mi vida (tanto laboral como a nivel personal), sino también es el fruto de mucha gente que estuvo a mi lado y que me apoyó cuando más lo necesité. Quisiera que de alguna forma ese apoyo este reflejado en estas páginas, así que por esa razón voy a dedicarles unas palabras.

A Tomás por haberme aceptado en su laboratorio por creer en mí y ayudar de forma invaluable a mi formación.

A mis padres Liliana y Teodoro y a mi hermano Javier, por estar ahí siempre que los necesité y por su ayuda incondicional.

A Cecilia, por su compañía a lo largo de todos estos años. Creo que es en estos momentos en los cuales me doy cuenta lo que realmente significó tu presencia a mi lado y lo mucho que influyó para estar hoy escribiendo estas líneas.

A mi familia, Patricia, Jorge, El Negro, Pia, Mariana.

A los chicos del laboratorio, Gaby, Trini y Matías con los que compartimos muchos años y muchas cervezas. Sin su ayuda este trabajo no hubiera salido adelante. Muchas gracias también a Ivan y a Alan que se sumaron al laboratorio y están dando sus primeros pasos en el mundo de la ciencia.

A Aitana porque me ayudó en uno de los momentos más difíciles de mi vida y me extendió su mano con una generosidad que nunca vi.

A Ana, muchas gracias por la ayuda con los experimentos, por las charlas y por enseñarme a Rick and Morty.

A Euge y a Luli, muchas gracias por la ayuda con el trabajo y por la buena onda.

Al laboratorio de Neurociencia Molecular y Celular, a Fer, Lola, Pau, Ana, Anto R, Anto B, a Facu y a Gustavo y Fernanda por las discusiones científicas, la ayuda con el trabajo y por supuesto muchas gracias por las risas.

A todos los miembros del IBCN que demuestran día a día que para hacer ciencia se necesita la ayuda de todos.

Finalmente a mis amigos, porque tuvieron que aguantarme durante todo este tiempo (y los tiempos que vienen) y algunos incluso me han acompañado al laboratorio algún fin de semana.

# Índice

1.	<b>Resumen</b> .....	8
2.	<b>Abstract</b> .....	13
3.	<b>Introducción</b> .....	17
3.1	El sistema de transporte intracelular.....	18
3.1.1	Elementos del sistema de transporte intracelular.....	20
3.1.2	Transporte axonal y transporte dendrítico.....	29
3.1.3	Regulación del sistema de transporte .....	31
3.1.4	Modelos de animales transgénicos para estudiar la relevancia de los motores moleculares.....	34
3.2	Circuitos neuronales que regulan la respuesta locomotora.....	38
3.2.1	Interacción vía directa e indirecta .....	41
3.2.2	Metabolismo de la Dopamina.....	42
3.2.3	Receptores dopaminérgicos .....	44
3.3	Enfermedad de Parkinson.....	51
3.3.1	Enfermedad de Parkinson y transporte axonal .....	54
4.	<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	57
5.	<b>Resultados</b> .....	60
5.1	Generación del ratón con delección neuronal condicional del motor molecular kif5b.....	61
5.2	Defectos del transporte axonal en neuronas deficientes en la expresión de kif5b. ....	64
5.3	La delección de kif5b no altera el volumen ni la morfología del cerebro. ....	67
5.4	La delección neural de kif5b induce hipolocomoción y una descoordinación motora en el ratón $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ .....	69
5.5	Los ratones $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ no presentan alteraciones en sus niveles de ansiedad. ....	73
5.6	Los circuitos periféricos de dolor no están alterados por la delección de kif5b. ....	74
5.7	El metabolismo de la dopamina depende de la expresión de kif5b.....	75
5.8	Los ratones $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ mejoran su capacidad motora en respuesta al aumento de la liberación dopaminérgica. ....	78
5.9	Desarrollo del ratón knockout condicional de kif5b en neuronas dopaminérgicas. ....	79
5.10	La delección de kif5b en neuronas dopaminérgicas no genera defectos en la locomoción. ....	83

5.11	La caída en la expresión de kif5b en las neuronas dopaminérgicas no genera defectos locomotores en ratones envejecidos.....	84
5.12	La delección de kif5b en neuronas dopaminérgicas no disminuye su sobrevivencia.....	86
5.13	Ratones $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{cre/+}$ responden normalmente a la estimulación del sistema nigroestriatal mediada por amfetamina. ....	88
5.14	La activación de la vía indirecta se encuentra alterada en los ratones $5b^{fl/fl} \text{ nes}^{cre/+}$ . ....	89
5.15	Los ratones $5b^{fl/fl} \text{ nes}^{cre/+}$ tienen menor nivel del receptor D2 en la membrana plasmática de la sinápsis.....	93
6.	<b>Discusión</b> .....	97
6.1	El transporte intracelular en la formación de la estructura del sistema nervioso. ....	98
6.2	Mecanismos moleculares afectados por la delección de kif5b. ....	102
6.3	Defectos en la vía nigroestriatal generados por alteraciones del transporte. ....	105
6.4	El rol del transporte en la enfermedad de Parkinson. ....	106
6.5	El transporte axonal es fundamental para la coordinación de las vías directa e indirecta. ....	107
7.	<b>Conclusiones</b> .....	109
8.	<b>Materiales y Métodos</b> .....	112
8.1	Animales y apareamiento. ....	113
8.2	Recombinación homóloga por cre recombinasa. ....	114
8.3	Genotipificación.....	114
8.4	Experimentos conductuales.....	115
8.4.1	Campo abierto .....	115
8.4.2	Rotarod .....	116
8.4.3	Laberinto en cruz elevado.....	117
8.4.4	Análisis del patrón de marcha.....	118
8.4.5	Sensibilidad al dolor.....	118
8.5	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	119
8.6	Drogas. ....	119
8.7	Cortes histológicos.....	120
8.7.1	Basofilia.....	120
8.7.2	Análisis volumétrico del cerebro.....	121
8.7.3	Inmunohistoquímica.....	121
8.7.4	Inmunofluorescencia. ....	122

8.8	Western Blot. ....	123
8.9	Cultivo celular. ....	124
8.9.1	Cultivo primario de hipocampo de ratón.....	124
8.9.2	Transfecciones y plásmidos usados. ....	124
8.9.3	Películas. ....	125
8.10	PCR en tiempo real.....	126
8.11	Fraccionamiento subcelular.....	127
8.12	Estadística .....	128
9.	<b>Bibliografía</b> .....	129



# 1. Resumen

## **Estudio del rol del transporte axonal en el sistema nigroestriatal en ratones knockout condicionales del motor molecular kif5b**

Los ganglios basales son una cadena de núcleos subcorticales que facilitan la coordinación motora. Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta modulan la actividad de las neuronas GABAérgicas del estriado que son inervadas por la corteza motora. En el estriado conviven dos tipos de neuronas GABAérgicas. Las de la vía directa, que expresan los receptores dopaminérgicos D1 estimulando los movimientos y las de la vía indirecta, que expresan los receptores dopaminérgicos del tipo D2, cuya función es inhibir los movimientos. Para la iniciación de los movimientos se requiere la activación conjunta de ambas vías. La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común. Se caracteriza por la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas, la cual genera fallas en la coordinación motora, defectos en la postura y problemas para el inicio de los movimientos. La enfermedad de parkinson está caracterizada patológicamente por el agregado intracelular de los cuerpos de Lewy (formados por  $\alpha$ -synucleína) y los ovillos neurofibrilares (formados por la proteína tau en estado hiperfosforilado). Estas marcas de patología sugieren que defectos en el sistema de transporte axonal podrían estar involucrados en la enfermedad. Las neuronas dopaminérgicas son células con una alta polarización que les permite conectar con neuronas localizadas a grandes distancias. Esta polarización las hace depender de un complejo sistema de transporte compuesto por microtúbulos, motores moleculares y cargas. Kinesina-1 es un motor molecular anterógrado que lleva las cargas hacia el cono axonal. Es un heterotetrámero de

dos subunidades pesadas (KHC) que interactúan con los microtúbulos y dos subunidades livianas (KLC) que interactúan con las cargas directamente o a través de proteínas adaptadoras. Existen tres genes que codifican para KHC, kif5a y kif5c que se expresan en el sistema nervioso y kif5b de expresión ubicua. Trabajos previos demostraron que ratones con defectos en la expresión del motor molecular KLC1 desarrollan patologías axonales con agregados de proteínas. Por otro lado, la delección de kif5b resulta letal y los ratones knockout mueren en el día embrionario 11.5 sin embargo su rol específico en el sistema nervioso no está esclarecido.

El objetivo de este trabajo es estudiar el rol específico de la subunidad Kif5b del motor molecular Kinesina-1 en la vía nigroestriatal. Se generaron ratones con delección de la expresión del motor molecular kif5b de forma condicional en neuronas del sistema nervioso central, usando el sistema cre-loxp dirigido mediante el promotor de nestina ( $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ ) para cumplir este objetivo. Experimentos de análisis del movimiento en el campo abierto y en el rotarod determinaron que los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presentan fallas en su actividad exploratoria y defectos en la coordinación motora. Por su parte, los niveles de dopamina no se habían visto afectados, sin embargo hubo una disminución en los niveles de degradación de dopamina, evidenciándose en una menor concentración del producto de degradación dopac. Estos resultados sugirieron un rol importante del motor kif5b en la vía nigroestriatal y en el metabolismo de dopamina.

Para testear si los defectos en el metabolismo de dopamina eran la causa de los defectos en la locomoción se realizó una delección condicional de kif5b específicamente en neuronas dopaminérgicas. Sorprendentemente, la delección de

Kif5b específica no indujo alteraciones en la respuesta locomotora sugiriendo que los defectos presinápticos no son suficientes para evidenciar defectos de coordinación o hipolocomoción. Para comprender si fallas en la locomoción se debían a problemas en la liberación de dopamina, esta se estimuló mediante la inyección de los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  con amfetamina. La estimulación con amfetamina, indujo un incremento en la distancia recorrida en ambos genotipos, permitiendo a los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  alcanzarla distancia obtenida por los ratones control estimulados. Para determinar si la actividad de las vías directa e indirectas del estriado se encontraban afectadas por la delección de kif5b se analizó la motricidad de los ratones en el campo abierto, utilizando agonistas y antagonistas de los receptores D1 y D2. El antagonista de los receptores D1 (SCH 23390) y el agonista de los receptores D2 (quinpirole) disminuyeron la distancia recorrida en los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  y control. Sin embargo, bajo la estimulación con amfetamina, los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  resultaron insensibles al tratamiento con quinpirole o con un antagonista de los receptores D2 (risperidona), mientras que si se observó una respuesta en los animales control. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la expresión de kif5b es necesaria para el correcto recambio de dopamina y para la presentación de los receptores D2 en la membrana plasmática de las neuronas estriatales permitiendo el correcto desarrollo de la capacidad motora.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, sugerimos que kif5b tiene un rol específico en el metabolismo de dopamina a la vez que su expresión es necesaria para la actividad de los receptores dopaminérgicos del tipo D2. Kif5b es

imprescindible para el correcto funcionamiento de la vía nigroestriatal y la locomoción.

**Palabras Claves:** Kif5b, vía nigroestriatal, receptores dopaminérgicos, dopamina, locomoción

## **2. Abstract**

## **Axonal transport role in the nigrostriatal in conditional knockout mice of the molecular motor kif5b**

The basal ganglia are a group of subcortical nuclei responsible of the motor coordination. Dopaminergic neurons from the sustancia nigra pars compacta modulate the activity of the GABAergic neurons from the striatum which are innervated by cortical neurons. In the striatum coexist two types of GABAergic neurons. Neurons from the direct pathway express dopamine receptors D1 like and stimulate movement, while GABAergic neurons from the indirect pathway express dopamine receptors D2 like and inhibit movement. Activation of both pathways is required for movement initiation. Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disorder. It is characterized by the dopaminergic cell neurodegeneration which induce motor coordination failures, postural instability, and impairments in the initiation of movements. Parkinson's disease pathological hallmarks include intracellular accumulation of Lewy Bodies (composed of  $\alpha$ -synuclein) and neurofibrillary tangles (composed of hyperphosphorilated tau). These hallmarks suggest that impairments in the axonal transport system could be related to the disease. Dopaminergic neurons are highly polarized cells. Such polarization allows them to connect with other cells localized far away from the soma. However this morphology depends on a complex transport system composed by microtubule tracks, molecular motors and cargoes. Kinesin-1 is a molecular motor which carries cargoes toward the axonal growth cone. Kinesin-1 is a heterotetramere composed by two heavy subunits (KHC) which interact with the microtubules and two light subunits (KLC) which interact with the cargoes directly or through adaptor proteins. There are three genes coding for KHC, kif5a and kif5c

expressed in the nervous system and the ubiquitously expressed kif5b. Previous publications have demonstrated that deletion of the KLC1 molecular motor in mice help the development of axonal pathologies with protein accumulation. Kif5b deletion is lethal and knockout mice die in the embryonic day 11.5. However the specific role of kif5b in the nervous system remains unknown.

The objective of this work is to study the role of the kif5b subunit of the molecular motor Kinesin-1 in the central nervous system. Conditional transgenic mice with deficits in kif5b expression in neurons were generated with the cre-loxp system directed under the nestin promoter ( $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ ) to fulfill this objective. Movement analysis in the open field and rotarod assays determined that  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  have defects in the spontaneous exploratory activity and in motor coordination. Dopamine levels did not change, however a decrease in the concentration of the dopamine degradation product, dopac was observed, indicating a lower degradation rate of the internalized dopamine. These results suggested an important role of the molecular motor kif5b in the nigrostriatal pathway activity and dopamine metabolism.

To analyze if dopamine metabolism impairments were the cause of the locomotion defects, we deleted kif5b from presynaptic dopaminergic neurons. Surprisingly, the specific deletion of kif5b did not induced alterations in the motor response suggesting that presynaptic defects are not sufficient to evidenciate coordination impairment or hipolocomotion. In order to understand if dopamine releasing was impaired, mice were injected with amphetamine to stimulate it. Amphetamine stimulation increased run length by both mice and remarkably  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  mice achieved the same distance run by stimulated control. To determine if the activity of the direct and indirect pathway were



impaired,  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  mice were the antagonist of the dopamine receptor D1 (SCH 23390) and the agonist of the dopamine receptor D2 (quinpirole) decreased run length in both genotypes. However under amphetamine stimulation  $5^{fl/fl} nes^{cre/+}$  mice were not sensitive to quinpirole or to the D2 antagonist (risperidone) treatment, while control mice responded to both drugs. All together the results obtained in this work, we suggest that kif5b has a specific role in the dopamine metabolism and its expression is necessary for the D2 receptors activity. Kif5b is fundamental for the proper function of the nigrostriatal pathway and locomotion.

**Key Words:** Kif5b, nigrostriatal pathway, dopamine receptors, dopamine, locomotion.

# **3. Introducción**

Las neuronas son células altamente polarizadas, formadas por un cuerpo celular donde reside el núcleo, dendritas y un largo axón que conecta con las demás neuronas. La liberación de neurotransmisores en el espacio sináptico y la presentación de receptores en las membranas post-sinápticas dependen de un complejo sistema de transporte intracelular mediado por motores moleculares funcionando sobre redes formadas por el citoesqueleto. En la vía nigroestriatal, el sistema de transporte intracelular resulta fundamental debido a la gran extensión de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra que proyectan largos axones hasta conectar con las neuronas del estriado. Esta vía es fundamental para el desarrollo de las capacidades motrices y para la coordinación motora. La enfermedad de Parkinson es una patología neurodegenerativa caracterizada por la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Los pacientes con esta enfermedad presentan diferentes síntomas de los cuales se distinguen los defectos posturales y motores debido a un deterioro progresivo de la vía nigroestriatal. Alteraciones en el transporte axonal han sido postulados como defectos relevantes presentes en la progresión de la enfermedad mediante el estudio de modelos genéticos y farmacológicos de Parkinson, sin embargo aún se desconoce si defectos tempranos en este sistema de distribución de proteínas pueden llevar al inicio de los fenotipos característicos de la enfermedad de Parkinson.

### **3.1 El sistema de transporte intracelular**

La necesidad de movilizar proteínas y organelas dentro de las neuronas requiere de un complejo y regulado sistema de transporte intracelular. Existen tres componentes fundamentales del transporte intracelular: los carriles (filamentos de microtúbulos o

actina), los motores (kinesinas, dineínas y miosinas) y las cargas (organelas y proteínas). Las cargas son distribuidas desde el cuerpo neuronal hacia la periferia o hacia las proyecciones en lo que se denomina el transporte anterógrado mientras que el transporte retrógrado recupera cargas desde la periferia hacia el cuerpo neuronal. A su vez existen, en cuanto a su velocidad, dos tipos de transporte axonal: el rápido que tiene una velocidad de 1 a  $5\mu\text{m/s}$ , donde se transportan organelas membranosas y el lento que ocurre entre  $0.004$  y  $0.04\mu\text{m/s}$ , donde se transportan proteínas citoplasmáticas. Es importante remarcar que en el transporte rápido y en el transporte lento participan los mismos motores moleculares y el transporte lento se debe a cortos periodos de movimiento, interrumpidos por largos periodos de pausa (De Vos et al, 2008; Roy et al, 2007; Stokin & Goldstein, 2006).

Además del transporte dependiente de los motores, hay otras fuerzas que tienen influencia en los movimientos moleculares que resulta en el transporte mediado por difusión. La difusión es un tipo de locomoción que depende de la temperatura, la viscosidad del medio y del tamaño de las moléculas que se mueven. Sin embargo una carga tardaría aproximadamente 30 horas para recorrer  $100\mu\text{m}$  lo cual hace que este tipo de transporte sea inviable para el tamaño de un axón, inclusive cargas grandes permanecerían casi inmóviles (Encalada & Goldstein, 2014). Por lo tanto, un mecanismo de motores moleculares debería entrar en juego para el transporte de complejos de proteínas como el proteasoma en modos de movimiento combinados entre difusivos, confinados y procesivos (Otero et al, 2014)

### **3.1.1 Elementos del sistema de transporte intracelular**

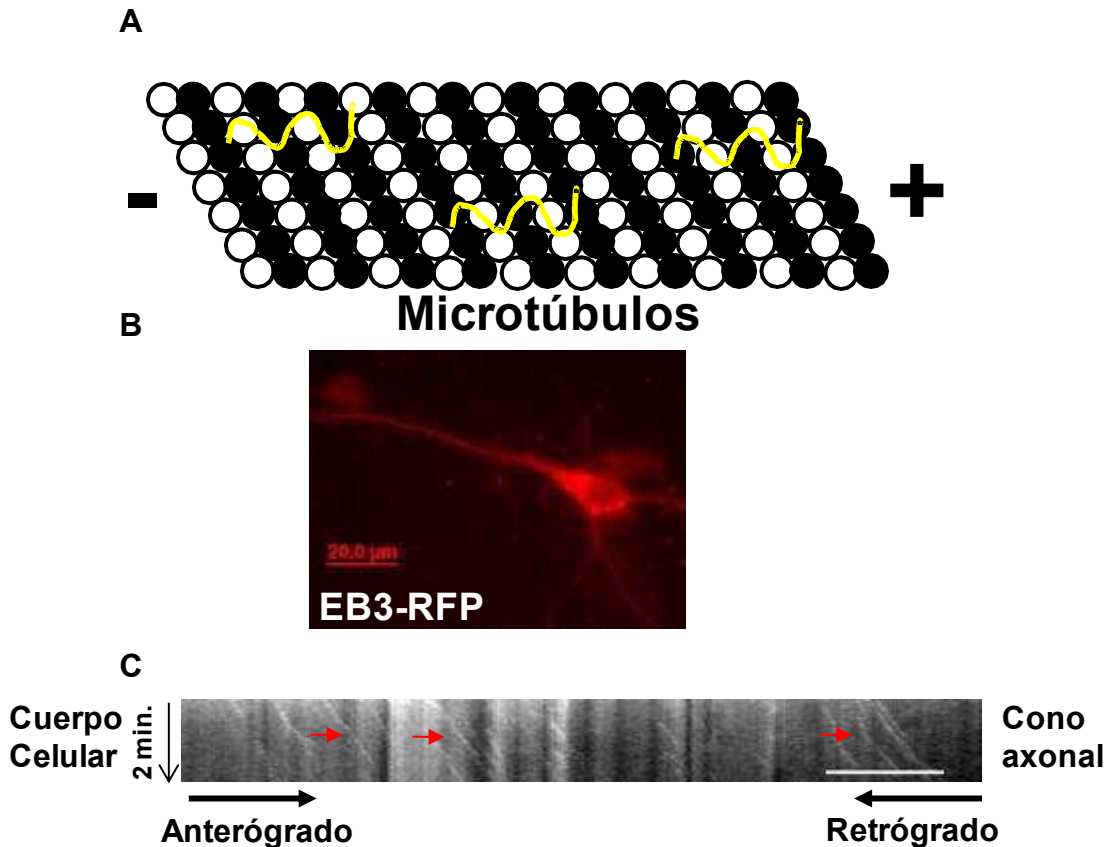
#### **Microtúbulos**

Los microtúbulos son polímeros formados por bloques de dímeros de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, ensamblados formando una fibra hueca y extensa. Los microtúbulos se encuentran polarizados, con un extremo positivo y un extremo negativo que poseen diferentes dinámicas de polimerización determinando que el lado positivo sea más dinámico y el negativo más estable. El extremo positivo de los microtúbulos cuenta con una tapa de GTP que aumenta su estabilidad. Además del GTP, existen proteínas llamadas EB que favorecen la desestabilización y la polimerización de los mismos (Akhmanova & Steinmetz, 2015) (Figura 1). Existen diferencias significativas a nivel de la organización de los microtúbulos entre el axón y las dendritas. En los axones esta organización está perfectamente ordenada con diferentes filamentos de microtúbulos a lo largo del axón que presentan el lado positivo orientado hacia la sinapsis y el lado negativo hacia el soma de la neurona. Esta distinción resulta muy relevante para el transporte axonal debido a que motores que caminen hacia una orientación serán los responsables de llevar cargas a la sinapsis y los contrarios de traerlas. En cambio, en las dendritas la orientación de los microtúbulos depende del tramo de la dendrita. En los segmentos iniciales, la mitad de los microtúbulos tiene el polo positivo hacia las proyecciones y la otra mitad hacia el cuerpo celular. Sin embargo en los segmentos más distales, la mayoría de los filamentos tienen su polo positivo orientado hacia la punta de las proyecciones dendríticas (Baas et al, 1988; Burton, 1988). Esta polarización determina que ambos tipos de motores tengan rol en traer y llevar cargas hacia y desde la

periferia. Axones y dendritas se diferencian no solo en el tipo de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) con los que interactúan sus microtúbulos, sino que también en los niveles de fosforilación (Ávila et al, 1994;Dehmelt & Halpain, 2004; Halpain & Dehmelt, 2006). Los microtúbulos además de ser sustrato de los motores moleculares responsables del transporte activo, sirven como soporte estructural de la morfología neuronal. La despolimerización de los microtúbulos resulta en la fragmentación del mismo, un evento muy relevante en procesos de muerte neuronal y significativamente asociado a la progresión de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Ren et al, 2005). Los experimentos realizados en ese trabajo, muestran que las neuronas dopaminérgicas son particularmente sensibles a la despolimerización de los microtúbulos. Este tipo neuronal resultó más sensible a la neurodegeneración producida por el fármaco rotenona (un agente despolimerizador de microtúbulos), mientras que otros tipos neuronales tardaban más en morir. Este efecto se producía también (aunque en menor medida) con el fármaco colchicina que tiene un efecto similar a la rotenona.

Las MAPs interactúan con los filamentos de microtúbulos ayudando a su estabilización y regulando las dinámicas de polimerización y despolimerización de los microtúbulos. Las MAPs clásicas están compuestas por las proteínas MAP1a/MAP1b y MAP2/tau. La familia MAP1 está compuesta de varios miembros, siendo MAP1a y MAP1b expresadas de forma predominante en neuronas. La familia MAP2/tau incluye a las proteínas MAP4 que no son neuronales y las proteínas neuronales MAP2 y tau. MAP2 es la proteína MAP más abundante del cerebro y se encuentra en la región somatodendrítica de las neuronas. Cuenta con tres o cuatro sitios de unión a los

microtúbulos y está encargada de su ensamblado y estabilización en dendritas (Goedert et al, 1991). Si bien algunas de las MAPs se unen de forma específica al polo positivo o al negativo, muchas interactúan a lo largo del microtúbulo. Dentro de las MAPs, la más relevante para la enfermedad de Parkinson es tau. Tau tiene varios sitios KXGS que pueden ser fosforilados. y existen alrededor de 20 kinasas que pueden fosforilar esos sitios (Dehmelt & Halpain, 2004; Halpain & Dehmelt, 2006). Cuando se encuentra en estado hiperfosforilado tau se desprende de los microtúbulos y forma agregados. Esta proteína es el componente principal de los ovillos neurofibrilares, a la vez que pueden ser parte de los cuerpos de Lewy, marcas patológicas de la enfermedad de Parkinson (Spillantini & Goedert, 2013). MAPT, el gen que codifica para tau, tiene varios exones y sitios de splicing que generan 6 isoformas las cuales varían en la cantidad de sitios de unión a los microtúbulos y cuya expresión está regulada durante el desarrollo (Qian & Liu, 2014). El splicing alternativo del exón 10 del gen MAPT genera dos isoformas de tau con 3 o 4 sitios de unión a los microtúbulos (3R y 4R respectivamente). Durante el desarrollo, el splicing de tau está dirigido hacia la forma 3R, sin embargo en el cerebro humano adulto se observa que hay un balance entre las isoformas 3R:4R. El balance entre las isoformas 3R y 4R regula el transporte axonal de la proteína precursora de amiloides (APP). Cuando este balance se rompe, disminuye la proporción de partículas anterógrada y retrógrada y aumenta la proporción de partículas estacionarias. Además disminuye la velocidad de movimiento de las vesículas, en promedio, en ambos sentidos (Lacovich et al, 2017).



**Figura 1. Los microtúbulos, las rutas del transporte intracelular.** Esquema de un microtúbulo formado por monómeros de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina (círculos blancos y negros). En amarillo están esquematizadas las MAPs. El microtúbulo está orientado de forma tal que el polo negativo esté a la izquierda y el polo positivo a la derecha (A). Imagen de una neurona hipocampal de ratón de día in vitro 4, transfectada con un plásmido que expresa la proteína cap de microtúbulos EB3 fusionada a la proteína fluorescente roja (EB3-RFP) (B) Gráfico de movimiento (kymograph) obtenido a partir de una película de un axón de una neurona transfectada con EB3-RFP (C). En el eje Y del kymograph, se determina el tiempo, mientras que en el eje X se determina la distancia. El axón está orientado con el cuerpo celular a la izquierda y el cono axonal a la derecha. Se observan las partículas (flechas rojas) viajando de forma anterógrada en el sentido del crecimiento del polo positivo del microtúbulo (derecha) (En materiales y métodos página 125 se explica mejor como se genera y analiza un kymograph). La ausencia de partículas retrógradas indica que la polaridad del microtúbulo se mantiene en todo el axón.



## **Motores moleculares**

Los motores moleculares son grandes complejos proteicos encargados de transportar las cargas hacia su destino. Se dividen en los motores que se asocian a microtúbulos y los asociados a filamentos de actina, y ambos realizan fuerza de tracción con gasto de ATP. De los asociados a microtúbulos existen dos superfamilias de motores. La superfamilia de kinesinas que transportan las cargas en sentido anterógrado y la superfamilia de dineína que transportan las cargas en sentido retrógrado. La dirección de transporte se debe al reconocimiento que hacen los motores moleculares de la orientación de los microtúbulos. Ambos motores tienen subunidades que interactúan con los microtúbulos, responsables del movimiento mediante gasto de ATP y subunidades que interactúan con las cargas directamente o a través de proteínas adaptadoras.

### **Kinesina**

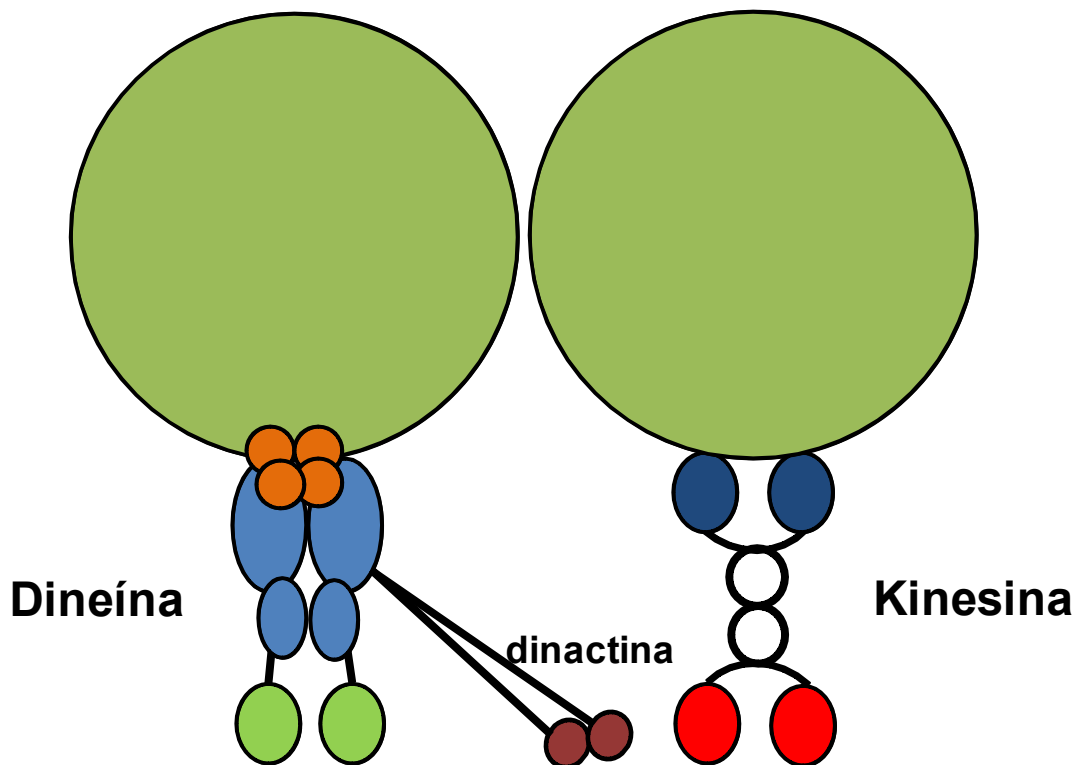
La superfamilia de las kinesinas es más grande en diversidad que las de las dineínas. Son motores moleculares que leen la polarización de los microtúbulos y se mueven en sentido anterógrado. Existen 3 tipos de kinesinas: las que tienen el dominio motor en el N-terminal (N-kif), las que tienen el dominio motor en el medio (M-kif) y las que tienen el dominio motor en el C-terminal (C-kif). Generalmente las N-kif transportan las cargas hacia el polo positivo mientras que las C-kif lo hacen hacia el polo negativo del microtúbulo. Estas se subdividen en 14 familias de kinesinas (Lawrence et al, 2004), siendo la kinesina convencional (kinesina-1) una de las más relevante dado que transporta un amplio número de cargas. Kinesina-1 es un heterotetrámero formado por

dos subunidades pesadas (KHC) y dos subunidades livianas (KLC). En mamíferos hay 3 genes que codifican para KHC: kif5A, kif5B y kif5C (Xia et al, 1998). Kif5A y kif5C tienen expresión neuronal mientras que la expresión de kif5B es ubicua para todas las células. KHC tiene un dominio de interacción con los microtúbulos y un dominio ATPasa que hidroliza ATP para poder realizar el transporte de vesículas (domino cabeza de kinesina). Hay 3 genes que expresan isoformas de KLC: KLC1 (enriquecido en neuronas), KLC2 (de expresión ubicua) (Rahman et al, 1998) y KLC3 (que se expresa en espermátidas) (Junco et al, 2001). KLC se asocia con la cadena pesada que posee un dominio cola el cual interactúa directamente o a través de proteínas adaptadoras con las cargas. Experimentos in vitro, determinaron que las dos cabezas de KHC en el motor Kinesina-1 se mueven dando unos 100 pasos de 8nm cada uno antes de liberarse de los microtúbulos (Coy et al, 1999). Esta propiedad de movimiento de manera continua sin desprenderse del microtúbulo es llamado procesividad. Mientras una de las cabezas se despega, la otra permanece interactuando con los microtúbulos. Cuando se libera fosfato inorgánico, la cabeza se despega de los microtúbulos, volviéndose a unir nuevamente cuando el ATP vuelve a interactuar con el dominio ATPasa (Isojima et al, 2016) (Figura 2).

## Dineína

Dineína es un complejo proteico compuesto por varias subunidades. El complejo consiste en dos cadenas pesadas (DHC), varias cadenas intermedias (DIC), livianas intermedias (DLIC) y livianas (DLC). Este complejo además interactúa con la proteína dinactina. DHC interactúa con los microtúbulos, moviéndose hacia el polo negativo. Es en estas subunidades donde se encuentra el dominio ATPasa. Sin ATP, DHC

interactúa fuertemente con los microtúbulos, cuando el dominio ATPasa se une a ATP, DHC se suelta de los microtúbulos y puede avanzar. Una vez que se hidroliza el ATP, DHC se vuelve a unir. DHC interactúa además con las dos DIC y pasan a través de estas para unirse a las DLIC. DIC, a su vez se une a las tres DLC, estabilizando el complejo. DLC por su parte se une a las cargas. Dinactina es un cofactor esencial para dineína-1. Se ha propuesto que dinactina ayuda a la unión de dineína-1 con las cargas y a su procesividad a través de los microtúbulos (Hirokawa et al, 2010) (Figura 2).



**Figura 2. Los motores moleculares.** Esquema de los motores moleculares. A la izquierda se representa dineína transportando cargas en sentido retrógrado hacia el soma celular. Dineína es un complejo multiproteico compuesto por dos subunidades pesadas (verde claro), cuatro subunidades medianas (azul) y varias subunidades livianas (naranja). Dineína interactúa con dinactina (bordo) que ayuda a aumentar su procesividad (A). A la derecha se representa kinesina, transportando la carga en sentido anterógrado hacia las sinapsis. Kinesina está compuesta por dos subunidades pesadas (rojo), un

tallo que conecta a las subunidades pesadas con las dos subunidades livianas (azul oscuro) que interactúan con las cargas.

## **Cargas**

Las cargas distribuidas a diferentes regiones de la neurona poseen una gran diversidad. Dentro de ellas podemos encontrar diferentes organelas membranosas compuestas por vesículas, estructuras tubulares y mitocondrias que son distribuidas tanto en dendritas como en el axón. Ha sido observado que estructuras membranosas pequeñas como vesículas sinápticas (Yonekawa et al, 1998), lisosomales (Deinhardt et al., 2006) y autofágicas (Cheng et al, 2015) son transportadas en velocidades rápidas y altamente procesivas. Estructuras membranosas más grandes y mitocondrias se transportan en un sistema intermitente rápido y lento con grandes periodos de no movimiento. Complejos proteicos también pueden ser transportados a grandes velocidades pero el común es que compartan diferentes modos de movimiento que incluyen el procesivo, confinado y difusivo como hemos descripto recientemente para el sistema de degradación ubiquitina-proteasoma (Otero et al, 2014). También se ha observado en experimentos de imagen en tiempo real realizados en células in vivo, que el cambio direccional del movimiento es un evento común. Estos cambios son saltatorios con frecuentes cambios de dirección, paradas y nuevos comienzos de movimiento (Encalada & Goldstein, 2014). Fallas en el transporte de cargas tales como el proteasoma y mitocondrias pueden ayudar al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Las cargas que cobran una mayor relevancia en la enfermedad de Parkinson son las mitocondrias y la  $\alpha$ -synucleína

Las mitocondrias son la planta de energía que abastecen a las células a la vez que ayudan a la homeostásis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Hollenbeck & Saxton, 2005). En las neuronas su transporte hacia las localizaciones donde se requiere un alto gasto energético (como las sinapsis y las ramificaciones axonales) es fundamental para el metabolismo neuronal (Sheng & Cai, 2012). Las mitocondrias se mueven de forma bidireccional, pausando su transporte por largos periodos de tiempo para luego volver a moverse (Hollenbeck & Saxton, 2005). Apenas un 30% de las mitocondrias se mueve, mientras que el resto permanecen en estado estacionario. Existen varios motores moleculares responsables del transporte anterógrado de las mitocondrias entre los que se encuentran Kif5 y dos miembros de la familia Kinesina-3. Las mitocondrias se anclan a los motores a través de diversas proteínas adaptadoras. Las primeras proteínas descubiertas fueron TRAK1 y TRAK2. La depleción de TRAK1 dio como resultado impedimentos en el transporte axonal mitocondrial. Por otro lado TRAK1 parece interactuar tanto con kinesinas como con dineínas, aunque por su parte TRAK2 solo interactúa con las dineínas (van Spronsen et al, 2013). Miro es un miembro de la familia Rho GTPasa que se encuentra en la membrana externa mitocondrial. Funciona como un receptor que une a los adaptadores TRAK1/2, reclutando los motores a la mitocondria (Cai et al, 2005). Otra proteína adaptadora capaz de asociar motores a la mitocondria con una función significativamente diferente es Syntabulina, que posee un dominio carboxi terminal transmembrana específico de mitocondrias. Syntabulina interactúa directamente con el dominio de unión a las cargas de Kinesina-1. La deleción de Syntabulina lleva a la acumulación de mitocondrias en el soma y una menor distribución en las ramificaciones (Cai et al, 2005).

Otra carga que toma relevancia en la enfermedad de Parkinson es la  $\alpha$ -synucleína, una proteína de 14kDA y de 140 aminoácidos (Maroteaux et al, 1988).  $\alpha$ -synucleína es sintetizada en el cuerpo celular y es transportada a los terminales axonales. Es una proteína que tiene un dominio amino terminal anfipático, un centro hidrofóbico y un dominio carbono terminal cargado negativamente (Emamzadeh, 2016). Varias funciones han sido atribuidas a  $\alpha$ -synucleína relacionadas con el tráfico de vesículas (Lee et al, 2011) y la liberación de neurotransmisores (Burré et al., 2010). La mayor proporción de  $\alpha$ -synucleína viaja en el transporte lento (76%), mientras que solo una pequeña porción se asocia a membranas y viaja en transporte rápido (Jensen et al, 1998; Jensen et al, 1999). Su asociación a membrana y su localización pre-sináptica permitieron identificar su rol en el anclaje de vesículas sinápticas como mediador de la liberación de neurotransmisores. Recientemente,  $\alpha$ -synucleína ha sido vinculada a defectos mitocondriales propuestos gracias a este fenómeno de asociación a membranas el cual induce un fraccionamiento mitocondrial anómalo cuando esta sobreexpresada (Pozo Devoto, en preparación).  $\alpha$ -synucleína tiene sitios de modificación post-traducciona, que al ser fosforilados disminuyen la fuerza de la interacción de  $\alpha$ -synucleína con las membranas regulando de esta forma su transporte axonal (Saha et al., 2004).

### **3.1.2 Transporte axonal y transporte dendrítico**

Las neuronas están compuestas por múltiples dendritas muy largas que van disminuyendo su diámetro a medida que se alejan del soma y un único axón que se

divide en varias ramificaciones, para conectarse con otras neuronas, cuyo diámetro permanece aproximadamente constante en toda su longitud. El axón además cuenta con un segmento inicial compuesto por una alta concentración de canales de sodio dependientes de voltaje, siendo el punto de inicio de los potenciales de acción. Por otro lado, la maquinaria de síntesis de proteínas se concentra en el cuerpo celular y en los segmentos proximales de las dendritas. El transporte mediado por motores tiene que reconocer que cargas van a ir hacia la pre-sinapsis a través del transporte axonal y que cargas se van a dirigir a la post-sinapsis a través del transporte dendrítico (Kapitein & Hoogenraad, 2011). Varios trabajos abordaron la pregunta sobre como los motores se dirigen a uno u a otro compartimento. En el trabajo de (Burack et al, 2000) se estudió el transporte del receptor de transferrina humano (hTfR) que se dirige a las dendritas y el de la proteína de adhesión NgCAM que se localiza en los axones. Ellos observaron que si bien hTfR se encontraba únicamente en dendritas, NgCAM se encontraba también en dendritas y en el axón (Burack et al, 2000). Sin embargo NgCAM estaba en la membrana plasmática únicamente en el cono axonal. Estos resultados sugieren que hay al menos dos mecanismos de localización de cargas: uno que depende del transporte axonal y el otro opera a nivel de la membrana plasmática.

Por otro lado se sabe que el motor molecular Kif1 lleva precursores de vesículas sinápticas a los compartimentos axonales (Hirokawa, 1998) y el motor molecular Kif17 transporta cargas a las dendritas (Guillaud et al, 2003). Otros trabajos observaron que vesículas que normalmente deben viajar a las dendritas entraban en el axón, pero que inmediatamente o regresaban o detenían su movimiento (Al-Bassam et al, 2012). A su

vez este movimiento depende de la correcta polimerización de los filamentos de actina y del motor molecular Miosina Va.

Las mitocondrias son requeridas en dendritas y en axones por lo que no tienen una localización definida en la neurona. El motor molecular Kinesina-1 es uno de los responsables del transporte de mitocondrias junto con dineína. Kinesina-1 se encarga del transporte axonal de las mitocondrias mientras que dineína se encarga del transporte dendrítico (Spronsen et al, 2013). Sin embargo existen cargas dendríticas que son transportadas por Kinesina-1. Kinesina-1 está relacionada con el transporte de complejos que contienen RNA mensajero en dendritas (Kanai et al, 2004), el transporte del receptor AMPA (Setou et al, 2002) y el del receptor GABA (Twelvetrees et al, 2010).

Si bien no se comprende en su totalidad la forma en la que el motor reconoce los compartimientos celulares a los que se debe dirigir, se sabe que el citoesqueleto de actina y el segmento inicial del axón cumplen un rol fundamental para la correcta localización de las cargas (Leterrier & Dargent, 2014).

### **3.1.3 Regulación del sistema de transporte**

Para que las cargas lleguen a sus correspondientes destinos es necesario que el transporte intracelular esté regulado. Los sistemas de regulación del sistema de transporte aún no están claramente dilucidados sin embargo se conocen varios de sus actores principales. En principio la regulación puede ocurrir a varios niveles. El reconocimiento de la carga por parte de los motores y su unión, la velocidad funcional



del motor y el reconocimiento del destino son pasos altamente regulados. A su vez estos se interrelacionan, hay evidencia de que la interacción de kinesina-1 directamente con las cargas puede regular la activación del motor (Blasius et al, 2007; Fu & Holzbaaur, 2013). Dentro de las cargas que se transportan de forma anterógrada y retrógrada, hay varias que se sugieren que podrían estar implicadas en los mecanismos de regulación. Una de estas cargas es la proteína precursora de amiloides (APP) y el grupo de las proteínas que interactúan con JNK (JIP). JIP3 puede interactuar con KLC favoreciendo la interacción de kinesina-1 con los microtúbulos y a su vez interactuando con KHC para estimular la movilidad de kinesina-1 (Watt, Dixit, & Cavalli, 2015). Se vio que en ausencia de cargas, Kinesina-1 puede plegarse permitiendo la interacción de KHC con KLC y dejando a la kinesina inactiva en un estado de pausa (Dietrich et al, 2008). Otro trabajo demostró como los canales Kv3 activan kif5b inhibiendo los mecanismos que median la interacción entre KLC y KHC (Barry et al, 2013). Las cargas no necesariamente van en sentido anterógrado o retrógrado, sino que muchas son bidireccionales (mitocondrias, endosomas, la vesícula de APP), sin embargo aún está en discusión cómo se regula la dirección neta de movimiento. Otros trabajos apoyan la idea de que la fosforilación de los motores, de las proteínas adaptadoras e incluso de las cargas, es importante para la regulación del transporte. GSK3 $\beta$  es una kinasa que tiene un rol de modulador negativo del transporte retrógrado (Gao et al, 2015) y anterógrado (Morfini et al, 2002). Su inhibición farmacológica genera un aumento de las dinámicas de transporte mitocondriales. GSK3 $\beta$  es capaz de fosforilar tanto motores como proteínas adaptadoras. A su vez, GSK3 $\beta$  está regulada por la proteína presinilina-1 negativamente, presentando una

actividad aumentada en los ratones knockout de presinilina-1 (Pigino et al, 2003). Este aumento en la activación lleva a la fosforilación de KLC1 y a su desprendimiento de las cargas. Por otro lado ERK1/2 fosforila directamente a kinesina-1 y dineína regulando su asociación con las cargas. Por su lado la kinasa de estrés JNK fosforila a la proteína que interactúa con JNK (JIP), la cual tiene función de proteína adaptadora. Al fosforilarse estabiliza su unión con el motor y favorece el transporte anterógrado. Sin embargo se vio que mutantes de JIP que no son capaces de fosforilarse promueven el transporte retrógrado. Por lo que los niveles de fosforilación de JIP podrían determinar la dirección de las cargas (Gibbs et al, 2015).

Las MAP también tienen funciones regulatorias con respecto a la movilidad de los motores moleculares. Las kinesinas compiten con las MAPs por la interacción con los microtúbulos y por lo tanto las MAPs podrían bloquear el camino de las kinesinas. Por ejemplo ha sido descrito que tau reduce la distancia recorrida por las kinesinas y también su frecuencia de pegado (Dixit et al, 2010). Cuando las kinesinas se encuentran con tau en su recorrido, estas se despegan de los microtúbulos. Como fue mencionado previamente en el cerebro adulto se encuentran dos isoformas de tau a partir del splicing alternativo del exón 10 (3R y 4R) que se expresan en la misma proporción. Cuando ocurre un desbalance en la expresión de estas dos isoformas se generan defectos en el transporte axonal de APP que podrían ser explicados por la interacción de tau con los microtúbulos y con kinesina (Lacovich et al, 2017).

### **3.1.4 Modelos de animales transgénicos para estudiar la relevancia de los motores moleculares**

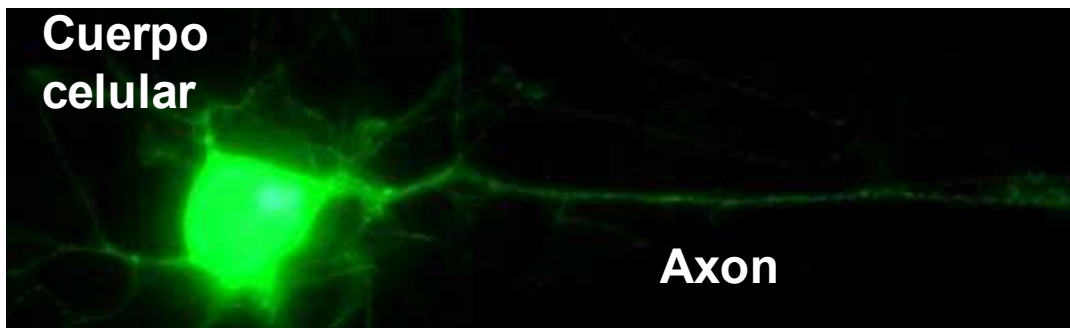
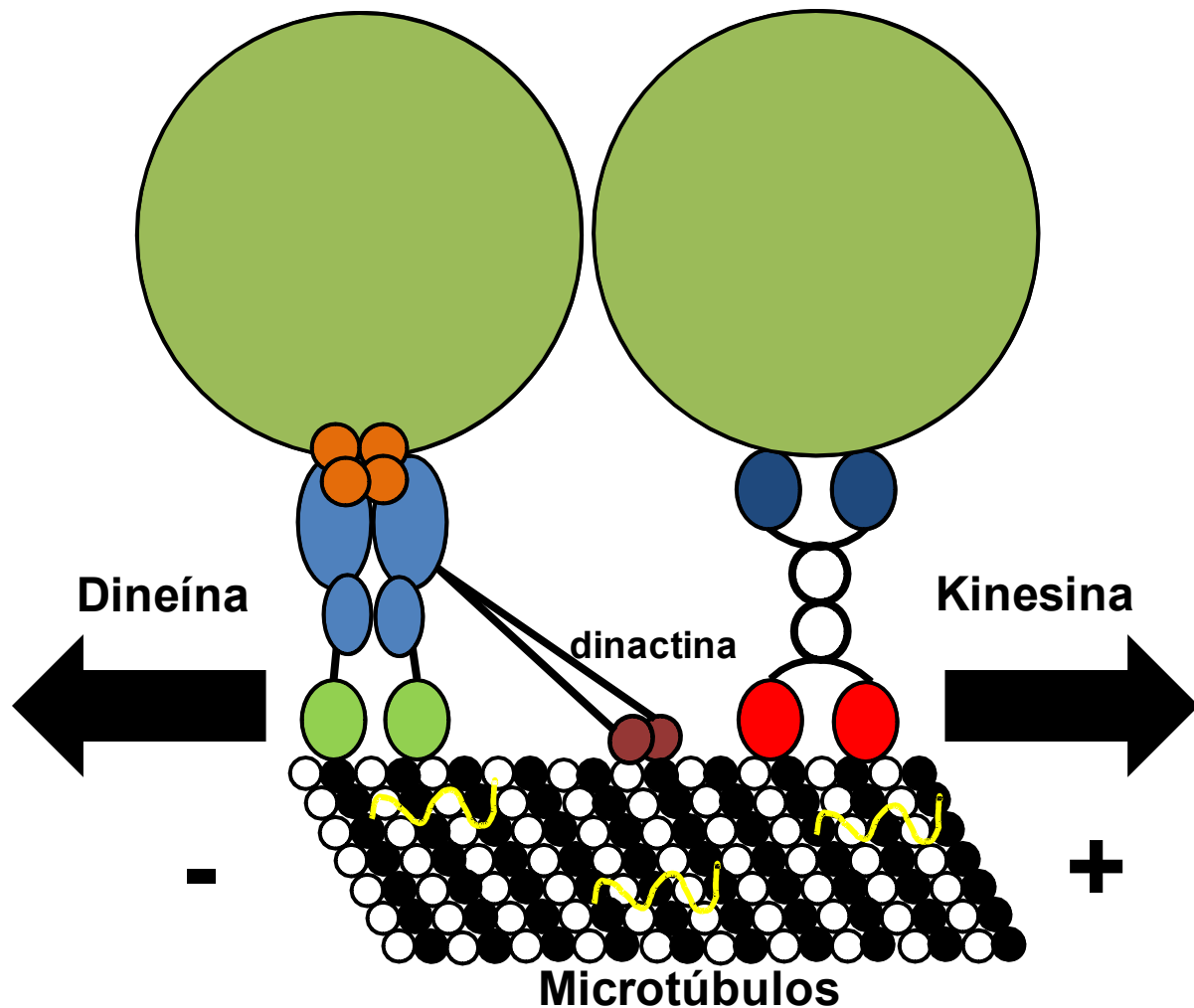
La necesidad de un correcto sistema de transporte axonal se pone en evidencia en numerosas enfermedades neurodegenerativas. En humanos mutaciones en proteínas que estabilizan los microtúbulos como tau, están vinculadas con el inicio de demencias frontotemporales y de Parkinsonismo además de ser las generadoras de las patologías de ovillos neurofibrilares. Mutaciones en genes que codifican para motores moleculares también llevan a la inducción de enfermedades como la paraplejia espástica hereditaria en mutaciones de KIF5A, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y Charcot-Marie-Tooth en mutaciones de dineína (De Vos et al, 2008). Esto pone en evidencia la necesidad de comprender la contribución de los defectos en motores moleculares en la inducción de enfermedades. Para ello, diferentes modelos animales de ratones transgénicos han sido generados aportando fuertes evidencias al conocimiento de su función. Los motores Kif1a y Kif1b son los responsables del transporte axonal de precursores de vesículas sinápticas (Niwa et al, 2008; Okada et al, 1995; Zhao et al., 2001). La delección de estos motores es letal durante el periodo perinatal debido a desórdenes neurológicos. Las neuronas presentan una menor densidad y número de vesículas sinápticas, en la zona presináptica. Además de defectos en el transporte vesicular, los ratones *kif1a<sup>-/-</sup>* y *kif1b<sup>-/-</sup>* muestran una alta tasa de muerte neuronal (Yonekawa et al., 1998; Zhao et al., 2001). Por otro lado, la delección de DHC es letal en el periodo embrionario (Harada et al, 1998), con una dispersión citoplasmática tanto del aparato de Golgi como del sistema endosoma-lisosomal. Si se produce una disrupción de la interacción dineína-dinactina por la sobreexpresión de dinamitina, se produce una

degeneración tardía de las moto neuronas similar a la esclerosis lateral amiotrófica de humanos (De Vos et al., 2008; Hirokawa et al., 2010).

Con respecto al motor molecular kinesina-1, se observaron diversos fenotipos de acuerdo a la subunidad que se afecte. Los ratones *klc1<sup>-/-</sup>* presentan defectos en el transporte axonal de APP, a la vez que se describieron agregados e hiperfosforilación de tau junto a la consecuente desorganización de los microtúbulos y la formación de axonopatías con acumulación de mitocondrias y organelas (Falzone et al, 2009). La materia blanca enriquecida en componentes axonales también se encuentra reducida en cortes de cerebro de estos animales observándose una disminución del tamaño del cuerpo calloso y deformación en la estructura del hipocampo. La delección de *klc1* lleva a un aumento de la actividad de la kinasa de estrés JNK, aumentando los niveles de fosforilación de tau (Falzone et al, 2009; Falzone et al, 2010).

Es interesante que las delecciones de *kif5a*, *kif5b* o *kif5c* tengan fenotipos diferentes, llevando a hipotetizar que cumplan funciones de transporte de diferentes moléculas u organelas. La delección de *kif5a* en todo el organismo es letal en ratones, aunque no muestran características de anomalías histológicas en el cerebro, sin embargo, los cuerpos celulares de las motoneuronas son más grandes (Xia et al, 2003). Cuando la delección se produjo postnatalmente el 75% de los ratones mueren, pero el 25% restante llega a vivir más de 3 meses, con acumulación anormal de neurofilamentos. En el trabajo de Nakajima, se observó que la delección postnatal de *kif5a* en ratones anomalías en el hipocampo debido al déficit en la expresión en membrana de los canales GABA observados mediante electroencefalograma (Nakajima et al, 2012). Por el contrario, la delección de *kif5c* no es letal, y el único fenotipo observable es una leve

disminución en el tamaño del cerebro (Kanai et al, 2000). Finalmente los ratones knockout sistémico de kif5b mueren en el día 11.5 embrionario (Tanaka et al, 1998). Cultivos de fibroblastos deficientes en Kif5b mostraron una distribución intracelular anormal tanto de lisosomas como de mitocondrias, sugiriendo una relevancia para este motor en el transporte de estas organelas en fibroblastos (Tanaka et al, 1998). Debido a esto, la función específica de kif5b en el sistema nervioso y la especificidad de cargas en neuronas no se encuentra establecida y es necesario un nuevo modelo genético preciso que nos permita estudiar su rol en circuitos neuronales relevantes como lo es la vía nigroestriatal.



**Figura 3. Esquema de los componentes del sistema de transporte intracelular.** Los microtúbulos están polarizados con el lado negativo hacia el soma y el positivo hacia las proyecciones. El motor molecular dineína transporta las cargas en sentido retrógrado hacia el soma celular en el axón, mientras que el motor molecular kinesina transporta las cargas en sentido anterógrado hacia las sinapsis. Imagen de una neurona transfectada con app-yfp con el cuerpo celular orientado a la izquierda y el cono axonal a la derecha (abajo).

### **3.2 Circuitos neuronales que regulan la respuesta locomotora**

La realización de movimientos complejos requiere de una regulación precisa llevada a cabo por circuitos neuronales del sistema nervioso central (Gerfen et al, 2011). Esta regulación es llevada a cabo por los ganglios basales y por la vía nigroestriatal. Los ganglios basales son una cadena de núcleos subcorticales que establecen conexiones del tipo cortico-basal-tálamo-cortical (Cisek & Kalaska, 2010; Redgrave et al, 1999). Los mismos están involucrados en procesos motores, cognitivos y de memoria. El núcleo más grande de los ganglios basales es el estriado, el cual comprende el caudado, el putamen y el estriado ventral (incluyendo el núcleo accumbens). Todas las zonas de la corteza (motora, sensorial y de asociación) inervan el estriado. El otro aferente que proyecta al estriado es el tálamo que forma conexiones excitatorias con las neuronas GABAérgicas espinosas mediales (MSN) del estriado (Bolam et al, 2000; Gerfen et al, 2002). Las MSN proyectan al resto de los ganglios basales y son moduladas por una fuerte inervación dopaminérgica por parte de la sustancia nigra pars compacta (SNc) a través de la vía nigroestriatal. La vía nigroestriatal es fundamental dado que fallas en esta vía (por ejemplo debido a muerte de las neuronas dopaminérgicas) generan problemas significativos en la locomoción tal como se observa en la enfermedad de Parkinson (Shulman et al, 2011). Las MSN se dividen en dos tipos, las MSN de la vía directa que expresan los receptores dopaminérgicos D1 y las MSN de la vía indirecta que expresan receptores dopaminérgicos D2 (Gerfen et al., 1990). Las MSN de la vía directa extienden sus axones GABAérgicos al segmento interno del globus pallidus (GPi) y al segmento externo del globus pallidus (GPe) y a la





(flecha verde). Las neuronas MSN de la vía directa (flechas rojas) extienden sus axones hacia el GPe, el GPi y a la SNr. Las MSN de la vía indirecta (flechas azul oscuro) extienden sus axones al GPe. El GPe se conecta con GPi (flecha naranja) y con el NST (flecha rosa). El NST regula las conexiones entre GPi y SNr (flechas violeta oscuro). Las MSN de la vía directa están moduladas por los receptores dopaminérgicos del tipo D<sub>1</sub>R y las de la vía indirecta por los receptores del tipo D<sub>2</sub>R.

Como ha sido resaltado, la vía directa e indirecta bajo la acción de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 respectivamente son las encargadas de realizar un control fino de la iniciación y regulación de los comportamientos motores (Cui et al., 2013). De acuerdo al modelo clásico del funcionamiento de los ganglios basales, el control del movimiento se obtiene por las pausas en la inhibición tónica de la actividad, dadas por la estimulación de la vía directa. Mientras que la vía directa estimula el movimiento, la indirecta lo inhibe. La actividad de la vía directa y de la indirecta está coordinada para seleccionar programas motores particulares e inhibir programas motores competidores (Kravitz et al, 2013; Mink 2003). De esta forma el estriado selecciona una acción determinada de una alta cantidad de variables a partir de la información que obtiene de la corteza.

Llevar a cabo una tarea motora requiere tanto una selección de la acción apropiada como de la inhibición de otras respuestas motoras. Se consideran dos tipos de respuesta inhibitoria. Una respuesta inhibitoria global que reacciona a una señal para detener todo tipo de comportamiento motor y la inhibición selectiva que permite detener un componente particular del movimiento de forma tal de que una tarea precisa pueda ser llevada a cabo (Mink 2003). De este proceso inhibitorio son participes la vía hiperdirecta y la vía indirecta respectivamente. La vía hiperdirecta se establece a partir del núcleo subtalámico (NST) que recibe inervaciones directamente desde la corteza

(Nambu et al, 2002; Tewari et al, 2016). Aunque se esperaría que la vía directa estuviera estimulada durante los momentos de actividad mientras que la indirecta se encuentre apagada, es importante señalar que trabajos recientes han determinado que durante las actividades motoras la vía directa y la vía indirecta aumentan su actividad, a su vez en los períodos de reposo ambas vías bajan su actividad (Cui et al, 2013).

### **3.2.1 Interacción vía directa e indirecta**

Para el inicio del movimiento es necesario que ambas vías estén coordinadas temporalmente. Esta coordinación está dada por la liberación de dopamina y porque existen conexiones entre la vía directa y la indirecta. De las neuronas del estriado, solo un 37% proyectan exclusivamente a GPe en rata (puramente de la vía indirecta), 3% solamente proyectan a la SNr y a GPi (puramente de la vía directa) y el 60% restante proyecta a la SNr/GPi y tiene terminales en el GPe (Fujiyama et al, 2011; Kawaguchi, 1990; Wu et al, 2000). Estos terminales tienen la capacidad de ser un puente entre las vías directa e indirecta. La actividad de la vía indirecta induce el crecimiento de estos terminales puente (Cazorla et al, 2014). También se encontró que en el núcleo accumbens las neuronas de la vía indirecta tienen sinapsis funcionales con las neuronas de la vía directa y de la vía indirecta. Sin embargo las neuronas de la vía directa presentan proyecciones colaterales solo a las neuronas de la vía directa y muy rara vez a las de las de las vías indirecta (Taverna et al, 2008; Tecuapetla, 2010). Estas proyecciones colaterales son inhibitorias y permiten regular la excitabilidad de las MSN. Regulando la inhibición lateral, la activación de los receptores D2 desinhiben las MSN

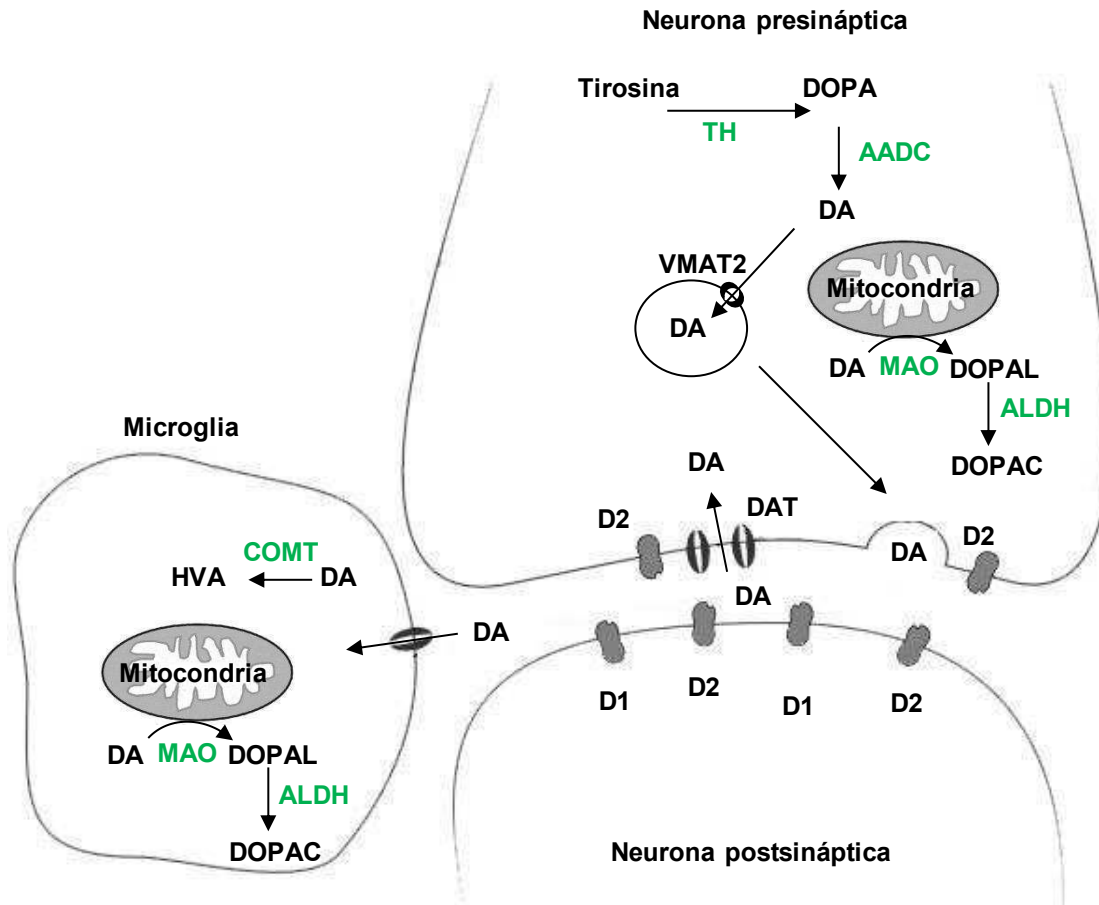
de la vía directa (Dobbs et al., 2016). De esta forma se evidenció que anatómicamente existe una coordinación entre ambas vías.

### **3.2.2 Metabolismo de la Dopamina**

La dopamina es el neurotransmisor que controla las vías directa e indirecta. Este neurotransmisor cumple un rol fundamental en el funcionamiento de la vía nigroestriatal y en consecuencia regula la locomoción (Shulman et al, 2011). Su metabolismo depende fuertemente del transporte intracelular de vesículas y proteínas necesarias para la síntesis y liberación de vesículas con neurotransmisores. Inicialmente se creía que la dopamina era un mero precursor de la síntesis de la epinefrina, sin embargo, con el tiempo se descubrió que esta catecolamina cumple funciones específicas. Los mayores productores de dopamina en el sistema nervioso central son el área tegmental ventral (VTA) y la SNc (Hegarty et al, 2013). La biosíntesis clásica de dopamina se produce a través de dos pasos de reacción que toma lugar en el citosol. La primer reacción es la hidroxilación de la L-tirosina por la enzima tirosina hidroxilasa (TH), siendo este el paso limitante de la producción de dopamina (Daubner et al, 2011). A su vez la estabilidad de TH es controlada por su interacción con otras proteínas ( $\alpha$ -synucleína, DJ-1) (Ishikawa et al., 2009; R. G. Perez et al., 2002). Esta reacción genera el metabolito DOPA y depende del cofactor BH<sub>4</sub> que es sintetizado a partir de GTP mediante la enzima GTP ciclohdroxilasa (Meiser et al, 2013). DOPA es luego descarboxilada a dopamina por la enzima aminoácido aromático descarboxilasa (AADC). Una vez sintetizada la dopamina es almacenada en las vesículas a través de

un transportador de monoaminas tipo 2 (VMAT2) que ingresa al neurotransmisor en contra de gradiente y con gasto de energía, previniendo el estrés oxidativo en el citosol (Figura 5) (Lohr et al, 2015).

Luego de la excitación de las neuronas dopaminérgicas, la dopamina es liberada al espacio intersináptico tal vez ayudada por el docking generado por synucleína donde va a interactuar con los receptores dopaminérgicos. Para detener la señal existen dos métodos. Por un lado la dopamina es recaptada por las neuronas dopaminérgicas gracias al transportador de dopamina DAT, el cual permite cortar la señal dopaminérgica. La dopamina recaptada es incorporada a las vesículas mediante VMAT2. La dopamina que queda en el citosol es rápidamente degradada por la enzima monoamina oxidasa (MAO). Esta reacción genera peróxido de hidrógeno y el reactivo DOPAL que puede ser reducido a DOPET o ser oxidado a DOPAC. El camino mayoritario es la oxidación a DOPAC. Por el otro, También puede ser capturada por las células de la glía para su degradación. En la glía la dopamina es degradada por la enzima MAO, pero también por la enzima COMPT que lleva a la formación de HVA (Meiser et al, 2013).



**Figura 5. Metabolismo de dopamina.** Esquema de la síntesis y degradación de dopamina. El aminoácido tirosina es transformado a DOPA a través de la enzima limitante TH, para luego ser descarboxilada a dopamina (DA) por la enzima AADC. La DA una vez sintetizada es guardada en vesículas a través del transportador VMAT2. La DA que no es almacenada es degradada en las mitocondrias por MAO, generando el metabolito DOPAL que después va a ser transformado a DOPAC. DA una vez liberada puede ser recaptada por DAT o ser importada por la glia donde va a ser degradada a DOPAC o a HVA mediada por la enzima COMT

### 3.2.3 Receptores dopaminérgicos

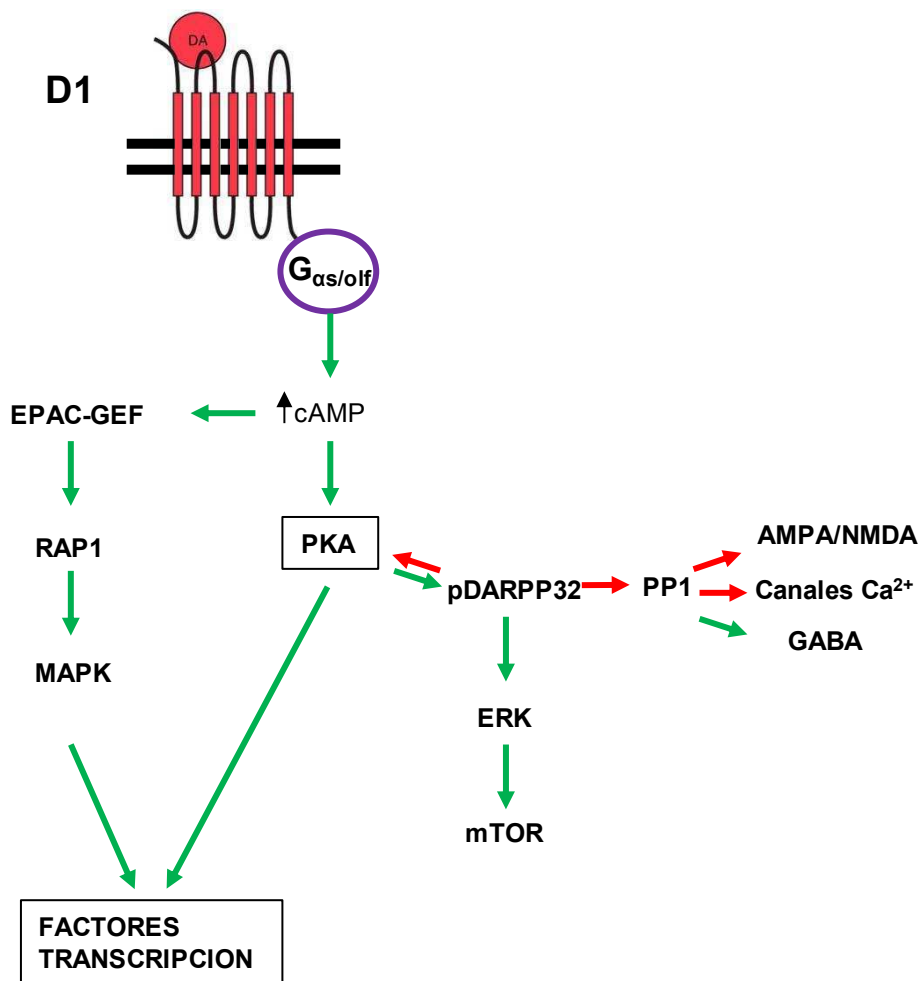
Los reguladores clave en la vía nigroestriatal y la posterior activación de las vías directa e indirecta son los receptores dopaminérgicos. La dopamina, una vez liberada en el espacio intersináptico, activa los receptores dopaminérgicos que están acoplados

a proteína G a través de los cuales modulan la actividad de la adenilil ciclasa. Estos receptores están divididos en dos tipos: D1 y D2, con diferentes propiedades farmacológicas (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Interesantemente, trabajos utilizando antagonistas radiactivos proponen que los receptores dopaminérgicos dependen de un sistema de transporte axonal para su presentación en membrana (Aiso et al, 1987; van Der Kooy et al, 1986). Sin embargo se desconocen las dinámicas con las que se mueven estos receptores así como tampoco los motores moleculares involucrados en dicha presentación.

## **Receptores D1**

Los receptores de la familia D1 se dividen en dos subtipos (D1 y D5) (Tiberi et al., 1991). Los receptores D1 son expresados en las neuronas estriatales de la vía directa que además expresan los neuropeptidos P y dinorfina. La activación de estos receptores induce la actividad de adenilil ciclasa (AC) que genera la acumulación de cAMP, a través de proteínas  $G\alpha_{s/olf}$  (Neve et al, 2004). Esta acumulación promueve la activación de la kinasa dependiente de cAMP (PKA). PKA fosforila a la fosfoproteína regulada por cAMP de 32kDa (DARPP32) en la treonina 34, induciendo la inhibición de la fosfatasa de proteínas-1 (PP1) (Hemmings et al, 1984), mientras que la fosforilación de DARPP32 en la treonina 75 por cdk5 induce la inhibición de PKA, generando una respuesta que corta la señal (Greengard, 2001). Tanto la activación de PKA como la inhibición de PP1, genera cambios en los canales AMPA, NMDA y GABA<sub>A</sub> que tienen funciones importantes en la actividad eléctrica neuronal (Neve et al, 2004). Por otro

lado, PKA directamente o a través de DARPP32 puede activar a las kinasas ERK1 y ERK2 involucradas en cambios en la expresión génica (Gerfen et al., 2002). Otra de las vías de activación de cAMP es la vía de las Map kinasa que está implicada en la activación del elemento de unión proteico en respuesta a cAMP (CREB), involucrado en el aumento o en la disminución de la expresión de genes (Konradi & Cole, 1994; F. C. Liu & Graybiel, 1996). La activación de los receptores D1, también activa la vía de PLC que aumenta la concentración de inositol trifosfato (IP3) induciendo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el cual aumenta la liberación de neurotransmisores por exocitosis (Lee et al., 2004). La regulación de la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa también esta manejada por los receptores de tipo D1 (Figura 6).



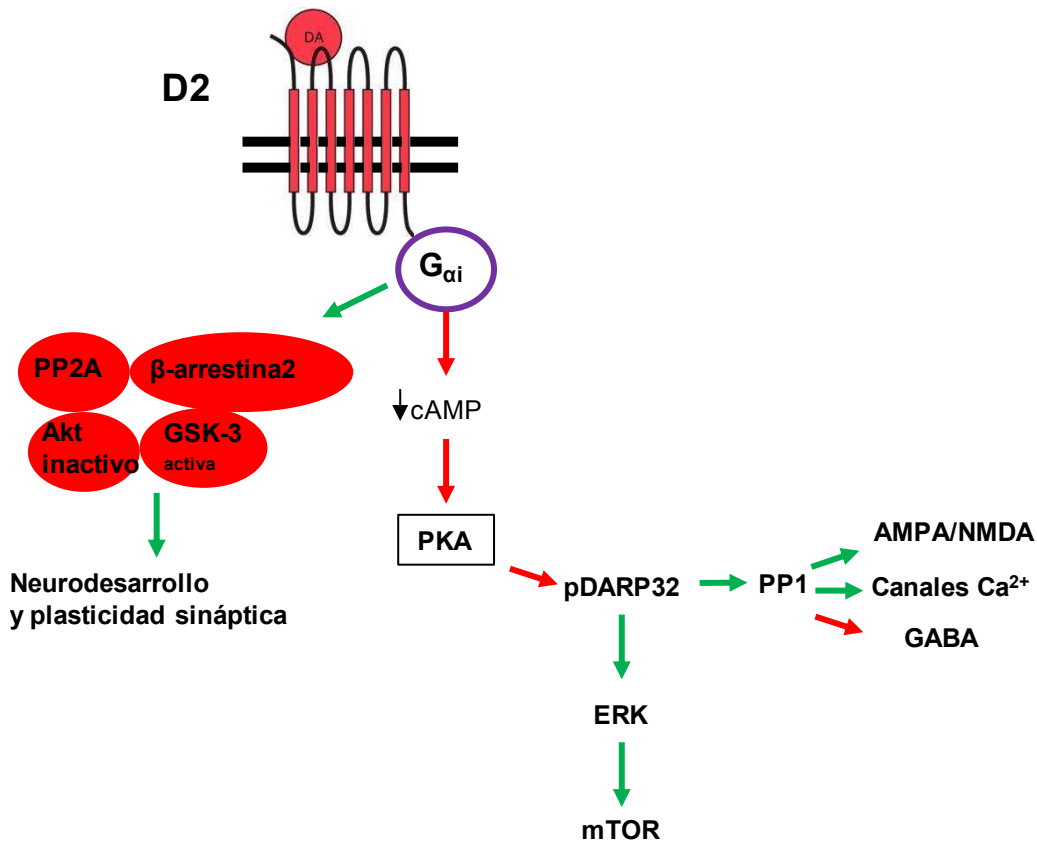
**Figura 6. Vía de señalización del receptor dopaminérgico D1.** En verde se marcan las activaciones y en rojo las inhibiciones. La activación del receptor D1 lleva a la activación de los receptores GABA y a un aumento en la síntesis de proteínas. DARPP32 genera un feedback negativo, inhibiendo PKA.

## Receptores D2

Los receptores de la familia D2 se dividen en tres subtipos (D2, D3 y D4). Los receptores del subtipo D2 son expresados en las neuronas estriatales de la vía indirecta y en la presinapsis de las neuronas de la sustancia nigra (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Por splicing alternativo se generan dos isoformas, los D<sub>2S</sub> y los D<sub>2L</sub>, los cuales tienen funciones biológicas diferentes. Los D<sub>2S</sub> se expresan en la presinapsis



y tienen funciones de autoreceptor, la isoforma  $D_{2L}$  se expresa en la post-sinapsis (Usiello et al, 2000). La activación de los receptores  $D_{2S}$  lleva a la reducción de la liberación de dopamina, permitiendo terminar la señal y llevando a una menor respuesta locomotora (Usiello et al, 2000). La activación de estos receptores lleva a la inhibición de la AC de PKA y de DARPP32, quedando PP1 activa. Los receptores D2 activan a los canales de potasio acoplados a proteína G (GIRK) que median la respuesta eléctrica neuronal (Lledo et al, 1992). Los receptores D3 también pueden activar la vía MAPK, mandando señales de proliferación. La respuesta tardía de los receptores D2 está dada por el complejo D2- $\beta$ -arrestina, que activa la vía ERK/MAPK una vez que el receptor fue internalizado (Neve et al, 2004). La activación de los receptores D2 también activa la vía de señalización PKB que regula la actividad de mTOR y en consecuencia regula objetivos relacionados con la plasticidad sináptica y con procesos cognitivos (Beaulieu & Gainetdinov, 2011) (Figura 7).



**Figura 7. Vía de señalización del receptor dopaminérgico D2.** En verde se marcan las activaciones y en rojo las inhibiciones. La activación del receptor D2 lleva a la inhibición de los receptores GABA y estimula el neurodesarrollo y la plasticidad sináptica.

## **Función de los receptores dopaminérgicos en la locomoción**

Los receptores dopaminérgicos tienen una gran importancia para la función del sistema nigroestriatal y en la regulación de la actividad motora. Los ratones knockout de D1 tienen un menor tamaño que los ratones normales, además de que necesitan una dieta suplementada con comida hidratada, aunque no presentan problemas motores (Drago et al, 1994). Sin embargo en el trabajo de McDougall, observaron que los ratones

deficientes en D1 se movían más e incluso tenían mayor movilidad cuando se estimulaba la liberación dopaminérgica con anfetamina (McDougall et al, 2005). El ratón obtenido por (Xu et al, 1994), también presentaba un leve aumento de la distancia recorrida. Farmacológicamente se vio que el agonista de los receptores D1, SKF 38393, genera un aumento de movimientos estereotipados en animales normales, pero la distancia de recorrido y la exploración vertical no se encontraban alteradas (Braun & Chase, 1986; Starr & Starr, 1986). En un trabajo de (Desai et al, 2005), se observó que SKF 38393 y otros agonistas del D1 (SKF 82958, SKF 81297, SKF, 77434, SKF75670) generan un aumento de movimiento en comparación con solución salina en algún momento de los experimentos que llevaron a cabo, aunque fueron menos efectivos que la cocaína.

Por otro lado, los ratones deficientes en D2 mostraron una disminución en la locomoción (Baik et al, 1995; Bay-Richter et al, 2013; Kelly et al, 1998). Cuando se les inyectó metanfetamina se generó un aumento en la liberación de dopamina observándose un aumento en la locomoción, sin llegar a los niveles obtenidos por los ratones normales (Kelly et al, 2008). Otro trabajo demostró que la inyección de anfetamina los ratones deficientes en el receptor D2 induce una hiperactividad similar a los ratones controles (Fan et al, 2010). Cuando se bloqueó la actividad de los receptores D1 con el antagonista SCH 23390 los animales knockout para el receptor D2 y los animales control disminuyeron de la misma forma su actividad. Los ratones con delección de los receptores D<sub>2L</sub> (expresados en la post-sinapsis del estriado) no mostraron defectos locomotores aunque los autores suponen que la falta de D<sub>2L</sub> se compensa (Usiello et al, 2000). Cuando se les inyectó el agonista de D2, quinpirole, los

animales disminuyeron la locomoción a una menor dosis. En este trabajo vieron además que los agonistas de los receptores de dopamina: apomorfina y SKF 82958 no pudieron aumentar la locomoción en los ratones. Incluso el aumento de la locomoción por el agonista de los receptores D1, SKF 81297, se vio disminuido. Estos resultados llevaron a la conclusión de que la delección de los receptores D<sub>2L</sub> genera un defecto en las señales de los receptores D1. La delección de los receptores presinápticos (autorreceptores) dopaminérgicos genera un aumento en la locomoción (Anzalone et al, 2012; Bello et al, 2011). Farmacológicamente se observó que en ratas, el agonista de D2, quinpirole, genera una disminución dosis dependiente en la locomoción (Braun & Chase, 1986). El agonista del D2 RU 24213 (al igual que quinpirole) generó una disminución de la locomoción en ratones (Starr & Starr, 1986). Raclopride, un antagonista del receptor D2 disminuye la locomoción en ratas (Kalyanasundar et al, 2015) y ratones (Xu et al, 2002). El eticlopride, otro antagonista, también disminuyó la locomoción (Collins et al, 2011). Estos resultados apoyan la hipótesis de que es necesaria la actividad de ambas vías para llevar a cabo la locomoción. Cuando la vía nigroestriatal se encuentra impedida se generan defectos en la motricidad.

### **3.3 Enfermedad de Parkinson**

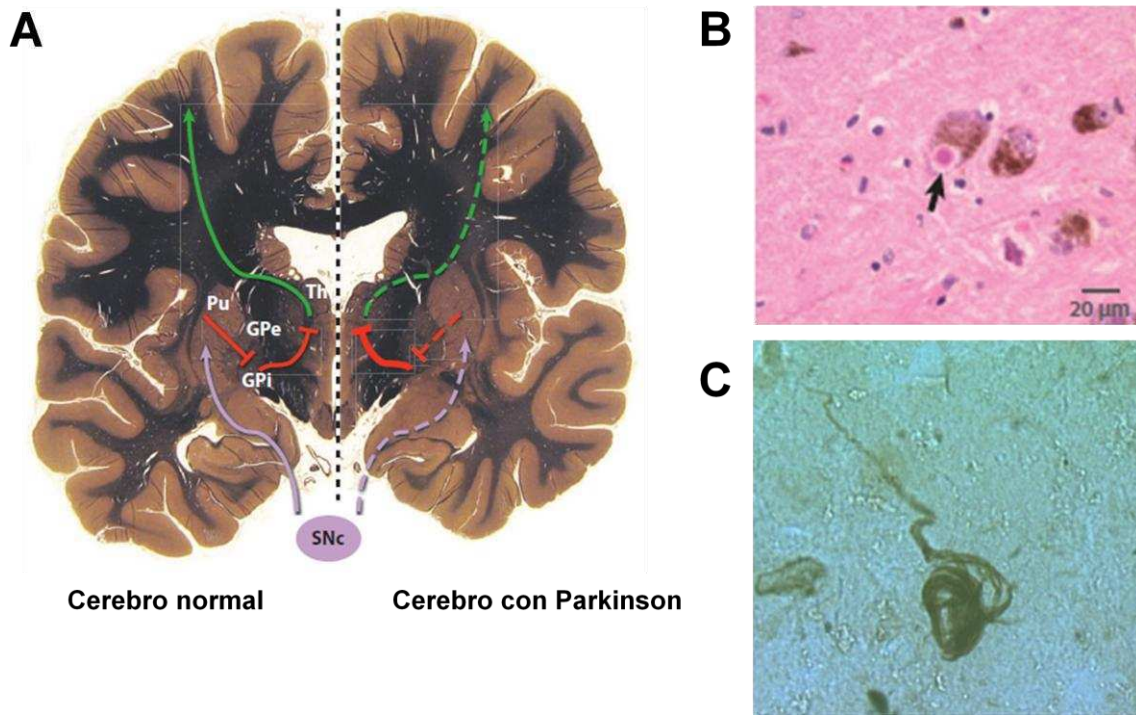
La enfermedad de Parkinson (PD) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, con una prevalencia del 1% en personas de 65 años que aumenta hasta llegar a 5% en personas mayores de 85 años (Shulman et al, 2011). Es una enfermedad progresiva que se va acentuando con la edad. Los problemas motores que se

manifiestan en PD incluyen movimientos lentos (bradikinesia), temblor en reposo, aumento del tono muscular, inestabilidad en la postura y problemas en los movimientos (Fahn, 2003). Además de los problemas motores PD presenta síntomas no motores tales como problemas digestivos, pérdida del sentido del olfato e insomnio que se presentan en el inicio de la enfermedad. En cuanto al conocimiento de su origen podemos distinguir tres tipos de PD: el familiar que ocupa menos del 10% de los casos y tiene un origen genético, el esporádico cuya etiología es desconocida siendo el mayor factor de riesgo la edad, y el farmacológico producido por drogas que entran a las células dopaminérgicas y deterioran principalmente las funciones mitocondriales (Shulman et al, 2011).

El defecto motor que caracteriza a la enfermedad de Parkinson se debe a la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Patológicamente, además de la neurodegeneración, se puede observar agregados citoplasmáticos de la proteína  $\alpha$ -synucleina, llamados cuerpos de Lewy (LB) (Dickson et al., 2009).  $\alpha$ -synucleina es una proteína de 140 aminoácidos que esta enriquecida en las presinapsis. Sin embargo ratones knockout para el gen  $\alpha$ -synucleina (SNCA) no presentan estrés neuronal ni degeneración, sugiriendo un efecto de ganancia de función en la enfermedad de Parkinson asociado a mutaciones de  $\alpha$ -synucleina (Abeliovich et al., 2000). En el año 1997 el análisis del linaje de una familia italiana con PD autosomal dominante llevó a la determinación de la mutación A53T de SNCA a la vez que estudios siguientes encontraron otras dos mutaciones: A30P y E46K (Shulman et al, 2011). Las mutaciones en SNCA disparan la enfermedad entre los 40 y los 50 años, y tienen una progresión mucho más rápida. A la vez que se descubrían las

mutaciones de SNCA, también se descubrió que SNCA es el mayor componente en los cuerpos de Lewy (LB) (Spillantini et al, 1997). Generalmente  $\alpha$ -synucleína se encuentra soluble y de forma no plegada, sin embargo, puede adoptar la forma de hojas plegadas  $\beta$  que favorece la polimerización en fibrillas. La mutación A53T y E46K generan un aumento en la tasa de formación de fibrillas (Bai et al, 2016). En modelos de sobreexpresión de  $\alpha$ -synucleína, la formación de agregados precedió a la muerte neuronal (Giráldez-Pérez et al, 2014). La aparición de los síntomas motores se debe a la muerte del 60% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, las cuales inervan el estriado y modulan la conexión de la corteza motora con el estriado.

La muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas se puede deber a varias razones. El mal plegado y los agregados de  $\alpha$ -synucleína, defectos en el sistema de autofagia-lisosomas, disfunciones mitocondriales, estrés del retículo endoplasmático (ER), desregulación del equilibrio del  $\text{Ca}^{2+}$  y defectos en el sistema de degradación ubiquitina-proteosoma (Michel et al, 2016; Shulman et al, 2011) (Figura 8).



**Figura 8. Axonopatías en la enfermedad de Parkinson.** Corte transversal de un cerebro normal (izquierda) y de un cerebro de un paciente con parkinson (derecha). Se muestra solamente la vía directa por simplicidad. En violeta están señaladas las conexiones de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (SNc) que degeneran en la enfermedad. En rojo se muestran las inervaciones inhibitorias del Putamen (Pu) al Globo Pálido y en verde las conexiones estimuladoras del tálamo a la corteza. Se puede observar como el cerebro de los pacientes tiene un menor tamaño. La muerte de las neuronas de la SNc lleva a la inhibición de las proyecciones tálamo corticales (A). Cuerpo de Lewy en una neurona dopaminérgica pigmentada. El cuerpo de Lewy tiene un centro eosinofílico y un halo que lo rodea pálido (B), fotos extraídas de Schulman et al., 2011. Tinción contra la proteína tau que marca un ovillo neurofibrilar del cerebro de un paciente con Parkinson (C).

### **3.3.1 Enfermedad de Parkinson y transporte axonal**

El transporte dependiente de microtúbulos es fundamental para el metabolismo neuronal. Fallas en cualquiera de sus elementos puede iniciar o ayudar al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Con el envejecimiento aparecen fallas en el transporte neuronal que son observados en diversas enfermedades neurodegenerativas. Además proteínas asociadas a este tipo de enfermedades suelen

tener tasas de transporte elevadas. Varios estudios demostraron la reducción de los microtúbulos axonales, cambios en la distribución de proteínas asociadas a microtúbulos (como tau y neurofilamentos) y la acumulación de proteínas tales como APP debido a la edad. A la vez, con el envejecimiento se observa un aumento de los ensanchamientos axonales producto de los agregados proteicos (Hirokawa et al, 2010; Stokin & Goldstein, 2006).

Muchos desordenes neurodegenerativos tienen un correlato genético que genera defectos en el transporte axonal (De vos et al, 2008). Un ejemplo podría estar representado por la proteína estabilizadora de microtúbulos tau que cuando se hiperfosforila deja de interactuar con los microtúbulos y forma ovillos neurofibrilares característicos del Parkinson sugiriendo un papel de la desestabilización de los sistemas de transporte axonal en esta enfermedad (Haggerty et al, 2011). Además defectos en el transporte de mitocondrias también son característicos de la enfermedad de Parkinson (Lu et al, 2014).

Varios estudios sobre Parkinson demostraron que los problemas sinápticos de función y conectividad aparecen tempranamente (Burke & Malley, 2013). Modelos animales mostraron una disminución de los terminales sinápticos dopaminérgicos junto con la aparición de axones distróficos y ensanchamientos axonales que preceden a la muerte de las neuronas dopaminérgicas. La caída en los niveles de dopamina se observa previamente a la pérdida de los cuerpos celulares (Cheng et al, 2010; Lundblad et al, 2012). Además, mutaciones en  $\alpha$ -synucleina generan una disminución del transporte axonal. Congruentemente, diferentes toxinas vinculadas con la enfermedad de



Parkinson, tales como MPP y 6-OHDA generan defectos en el transporte axonal en general (Morfini et al., 2007) y el de mitocondrias en particular (Lu et al, 2014).

El componente proteico principal de los cuerpos de Lewy,  $\alpha$ -synucleina, se transporta a una velocidad de 1.33mm/día (Saha et al., 2004). Sin embargo las mutaciones A53T y A30P tenían una menor tasa de transporte, lo cual podría explicar los agregados intracelulares (Saha et al, 2004). Por otra parte el aumento en la expresión de  $\alpha$ -synucleina humana genera una caída de la densidad de las vesículas del grupo de vesículas que pueden liberarse en la sinapsis (Nemani et al, 2010). Además fue comprobado que el aumento en la expresión de  $\alpha$ -synucleina desestabiliza la polimerización de tubulina y la estabilidad de los microtúbulos (Prots et al, 2013). Estos antecedentes sugieren fuertemente un rol muy importante del transporte axonal en la actividad y coordinación de la vía nigroestriatal. Sin embargo aún se desconocen los motores moleculares que participan de forma más activa. Por lo tanto el objetivo de este trabajo es comprender el papel del motor molecular Kif5b en la vía nigroestriatal y su implicancia en la coordinación motora.

# 4. Hipótesis y objetivos

La morfología neuronal genera que las conexiones sinápticas dependan de un sistema de transporte intracelular complejo. Trabajos previos han descrito que fallas en el sistema de transporte pueden generar ensanchamientos axonales y agregados intracelulares asociados con fenómenos de muerte neuronal. Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra debido a la gran arborización que tienen pueden ser particularmente susceptibles a una deficiencia en la maquinaria de transporte.

Si bien se conoce que la expresión del motor molecular kif5b es imprescindible para la sobrevivencia de un ratón, poco se sabe acerca de su rol específico en el sistema nervioso central y más precisamente en la vía nigroestriatal. Por lo tanto la hipótesis que se busca contrastar en esta tesis doctoral es que el motor molecular kif5b es fundamental para el funcionamiento de la vía nigroestriatal y su delección puede generar defectos en la locomoción y en la coordinación motora que pueden tener relevancia en las manifestaciones fenotípicas de la enfermedad de Parkinson.

Para evaluar esta hipótesis se va a buscar cumplir los siguientes objetivos específicos:

- **Caracterizar la función de kif5b en los sistemas de control motor mediante la delección del mismo en el sistema nervioso central.**

Este objetivo se va a llevar a cabo a partir de la delección condicional de kif5b en el sistema nervioso mediante el entrecruzamiento del ratón Kif5b floxeado con un ratón transgénico dirigiendo la expresión de la recombinasa CRE en neuronas. Se evaluarán las capacidades de respuesta motora del ratón a través de ensayos conductuales y su respuesta a drogas que regulan la estimulación

de la vía nigroestriatal. También, se analizarán dinámicas de transporte axonal en neuronas deficientes en Kif5b.

- **Caracterizar la función de kif5b en los sistemas de control motor mediante la delección del mismo en neuronas dopaminérgicas.**

Se generará un nuevo ratón mediante el entrecruzamiento del ratón Kif5b floxeado con un ratón transgénico dirigiendo la recombinasa CRE específicamente en neuronas dopaminérgicas. De esta forma se podrá evaluar la relevancia que tiene kif5b en este tipo neuronal.

- **Determinar los mecanismos que dependen de la expresión de kif5b en la vía nigroestriatal.**

A través de utilizar agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgicos buscaremos determinar si existen cambios en la activación de los mismos debido a la delección de kif5b. A su vez se evaluará su distribución subcelular en las neuronas mediante ensayos de fraccionamiento subcelular.

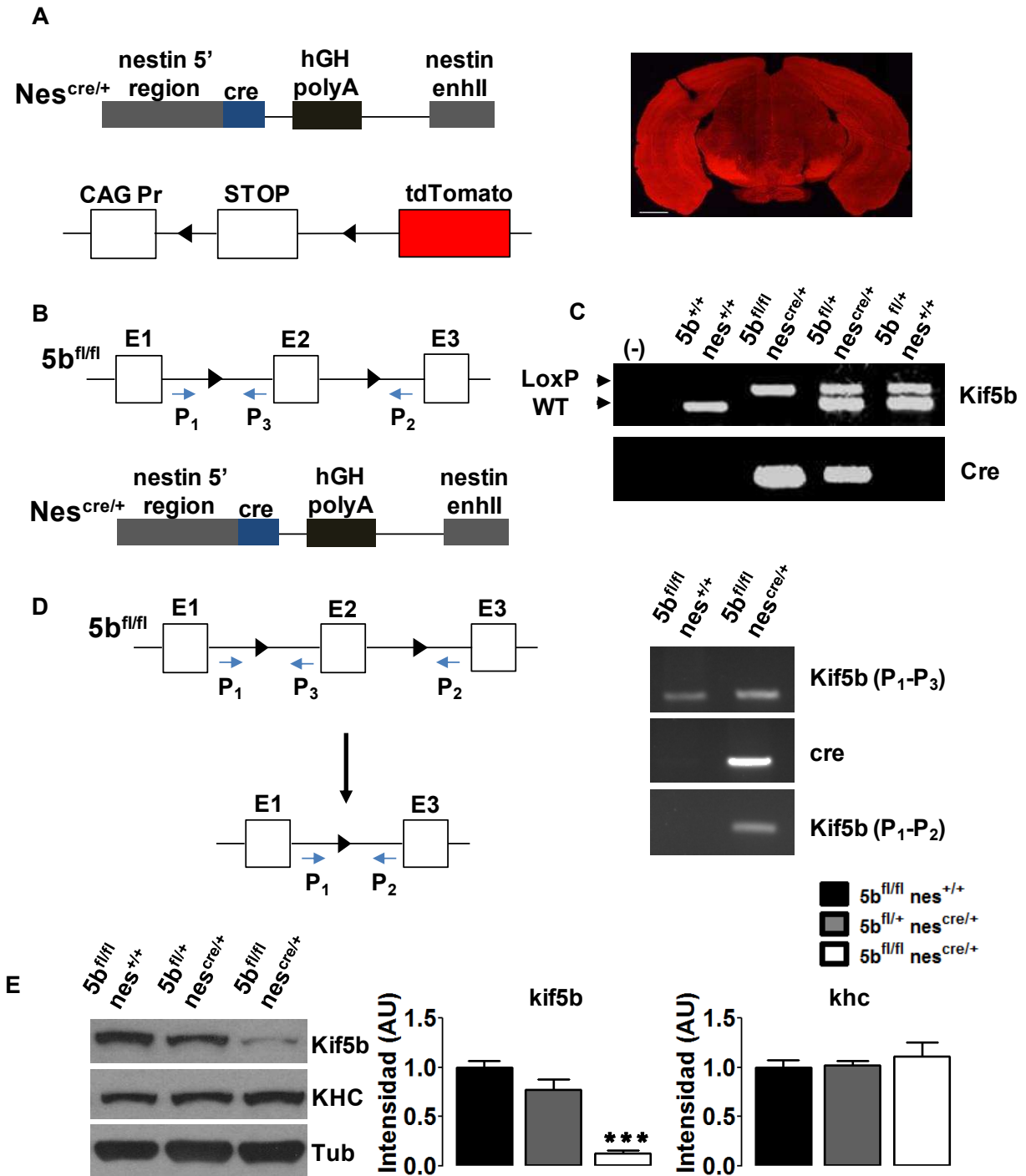
# **5. Resultados**

## **5.1 Generación del ratón con delección neuronal condicional del motor molecular kif5b.**

Para estudiar el rol del motor molecular kif5b en el sistema nervioso y en los circuitos de control motor se desarrolló un ratón knockout condicional de kif5b a través de la tecnología cre-loxp. De esta forma la delección de kif5b se realizó en todo el sistema nervioso central. La delección sistémica de kif5b en ratones es letal y los animales mueren en el día 11.5 después del coito (Tanaka et al, 1998). Resulta, por lo tanto, imprescindible generar un nuevo modelo para estudiar el papel que juega kif5b en el sistema nervioso. Con la intención de encontrar un modelo transgénico que dirija la expresión de la recombinasa CRE capaz de eliminar la expresión genómica de Kif5b en el sistema nervioso se evaluó la actividad de cre en ratones nes<sup>cre/+</sup>. Este animal fue cruzado con el ratón reportero Ai14 (Madisen et al., 2010). Las células que expresan CRE bajo el promotor de nestina, un neurofilamento intermedio que se expresa en los precursores neurales, (nes<sup>cre/+</sup>) (Tronche et al, 1999) recombinan un sitio stop flanqueado por los sitios loxp que va a permitir la expresión del fluoróforo tomato, haciendo que bajo luz UV, las células recombinadas emita color rojo. Se pudo observar que en el tejido nervioso de los animales nes<sup>cre/+</sup> ai14 se había recombinado el sitio stop, y por lo tanto mostraban fluorescencia roja (Figura 9A), indicando este modelo como un buen animal para eliminar la expresión de Kif5b en cerebro. Ratones con el exón 2 del gen kif5b flanqueado por secuencias loxp (5b<sup>fl/fl</sup>), exón en el cual se encuentra el ATG de inicio de la traducción (Cui et al, 2010), fueron cruzados con los ratones transgénicos que expresan la recombinasa CRE, bajo el promotor de nestina (Figura 9B). El genotipo de los animales obtenidos del entrecruzamiento del ratón 5b<sup>fl/fl</sup>

con el ratón  $nes^{cre/+}$  fue determinado mediante dos PCR, una para detectar los sitios loxp en el gen *kif5b* (usando los primers P1 y P3) y otra para la presencia del transgen de CRE (Figura 9C). De esta forma se consiguieron los siguientes genotipos: ratones control ( $5b^{fl/fl} nes^{+/+}$ ), heterocigotas ( $5b^{fl/+} nes^{cre/+}$ ) y ratones homocigotas delecionados con 100% de reducción de *kif5b* en cerebro ( $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ ). El proceso de recombinación genómica que elimina el exón 2 en el sistema nervioso fue evaluado mediante una PCR con los primers P1 y P2 a partir de DNA extraído de corteza (Figura 9D). Los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , demostraron la correcta escisión del exón 2 de *kif5b* luego de la PCR con secuencias de los primers P1 y P2, permitiendo amplificar una banda de 219 pb (Figura 9D). La caída en la expresión de *kif5b* se cuantificó mediante western blot de homogenatos de cerebro de los distintos genotipos, observándose que  $5b^{fl/+} nes^{cre/+}$  presenta una reducción del 50% de *kif5b* en el sistema nervioso y  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  una reducción de casi el 100% de *kif5b* en cerebro (Figura 9E). La expresión de *kif5b* observada en ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  fue casi nula (posiblemente debido a que proteínas provenientes de tejido conectivo donde no se recombino *kif5b* contaminaron el homogenato provenientes de las neuronas) sin embargo en los ratones  $5b^{fl/+} nes^{cre/+}$  los niveles de *kif5b* no disminuyeron (Figura 9E). Además, para evaluar una posible compensación por aumento en la expresión de otras subunidades de cadenas pesadas del complejo motor kinesina-1 evaluamos mediante western blot la expresión de *kif5a* y *kif5c* en los ratones generados (Figura 9E). Interesantemente observamos que no se produjeron cambios en la expresión de las otras cadenas pesadas de kinesina-1 en los ratones con 50% o 100% de deleción de *Kif5b*, contrario a lo que había sido reportado para el ratón  $kif5b^{-/-}$  (Tanaka et al, 1998). Estos análisis determinaron la correcta

obtención de un ratón sin expresión neural de kif5b que es viable y que puede ser utilizado para evaluar la función de Kif5b en el sistema nervioso central.



**Figura 9. Generación del ratón knockout condicional de Kif5B en neuronas.** Esquema del transgen cre (A). En el esquema del ratón nes<sup>cre/+</sup> se esquematizaron la zona reguladora del gen nestina (Nestin 5'



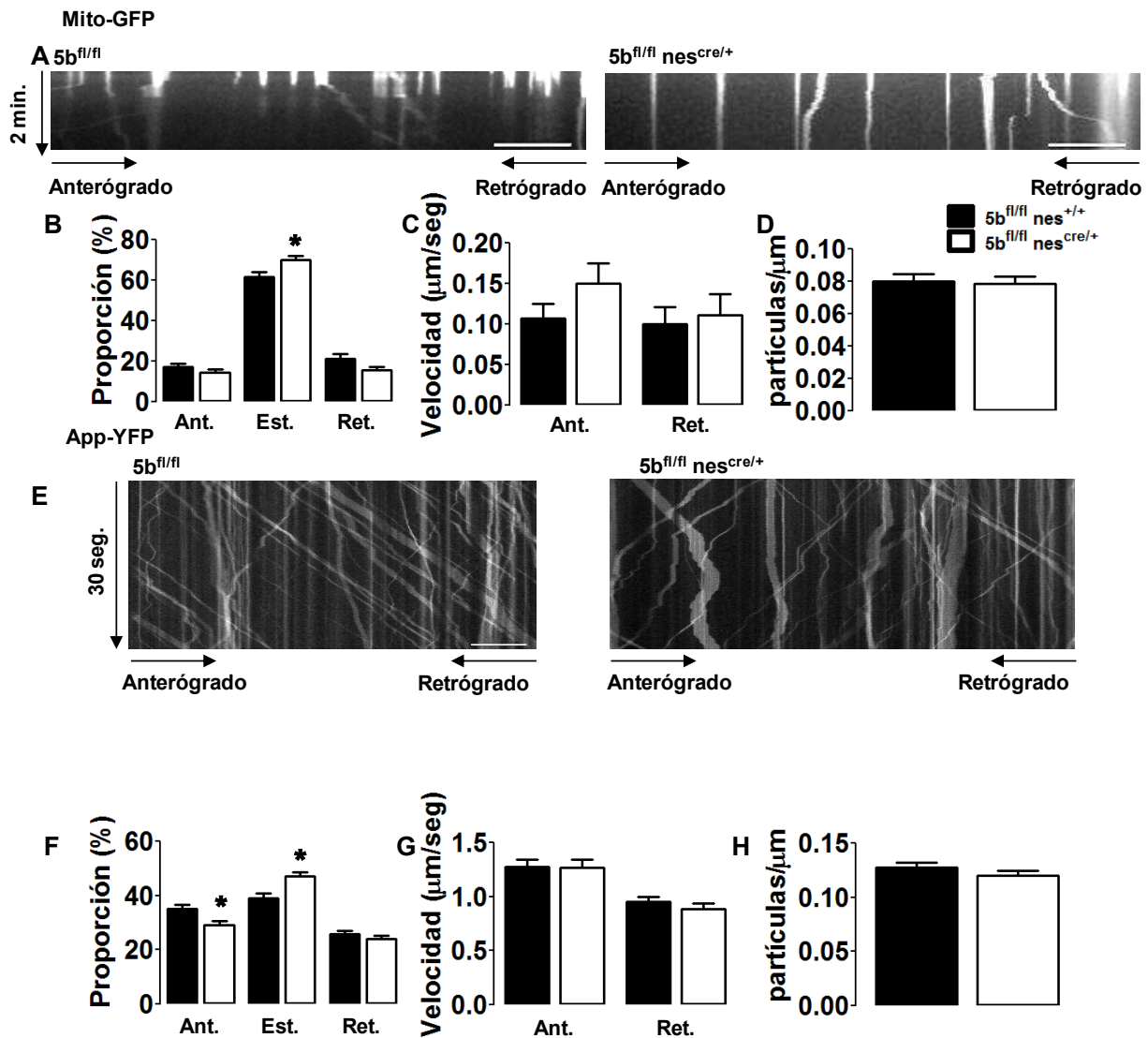
región cuadro gris), cre (cuadrado azul), secuencia de corte y poliadenilación de la hormona de crecimiento humana (cuadrado negro, hGH polyA) y el enhancer del gen de nestina para favorecer la expresión de cre (nestin enhII) (arriba). Esquema del transgen tomato del ratón ai14 (abajo). El transgen tiene un promotor fuerte (CAG Pr) seguido por un sitio stop flanqueado por dos secuencias LoxP (cabeza de flechas negra), a 3' se encuentra el gen tomato. Corte de cerebro del ratón nes<sup>cre/+</sup> ai14/+ (derecha). Las neuronas expresan tomato luego de la recombinación del sitio stop. Esquema del gen kif5b del ratón 5b<sup>fl/fl</sup> (arriba) y del ratón nes<sup>cre/+</sup> (abajo) (B). Con cabezas de flechas negras se marcan los sitios LoxP alrededor del exón 2 (E2). P1, P2 y P3 los primers que se usaron para la genotipificación (flechas azules). PCR realizada para la genotipificación de los ratones (C). Para los sitios loxP se usaron los primers P<sub>1</sub> y P<sub>3</sub>. Los ratones 5b<sup>+/+</sup> tienen una sola banda a 215 pb, los ratones 5b<sup>fl/+</sup> tienen dos bandas a 215 y a 275 pb y los ratones 5b<sup>fl/fl</sup> presentan una única banda a 275 pb. Los ratones que expresan cre tienen una sola banda a 300 pb. Esquema de la recombinación mediada por cre (izquierda) y pcr con los primers P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> (derecha) (D). La banda se amplifica solo cuando se recombina el exón 2. Western blot de homogenatos de cerebros n: 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/+</sup> = 10, 5b<sup>fl/+</sup> nes<sup>cre/+</sup> n = 4, 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup> = 10 \*\*\*p < 0.001 test t (E).

## **5.2 Defectos del transporte axonal en neuronas deficientes en la expresión de kif5b.**

Para evaluar el transporte axonal debido a la delección de kif5b, se estudiaron las dinámicas de transporte en tiempo real de mitocondrias y de la vesícula de APP, dos cargas que son transportadas activamente por kif5b (Kamal et al, 2000; Tanaka et al, 1998). Para poder determinar si las dinámicas de transporte axonal mitocondrial estaban disminuidas en los ratones 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup> se hicieron experimentos de imagen en tiempo real (Figura 10A). Cultivos de células hipocámpales de día 7 in vitro, de animales control (5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/+</sup>) y 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>, fueron transfectados con un plásmido que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) fusionada a un péptido señal de localización mitocondrial de la proteína citocromo C humana (mito-GFP) (Falzone et al, 2009). Se realizaron películas de los axones de las neuronas control y 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup> transfectadas y las películas obtenidas se transformaron a gráficos de movimiento (kymographs) (Figura 10A). A partir de los kymographs se analizaron las dinámicas de movimiento mitocondriales (proporción de partículas, velocidad y densidad) (Falzone et

al, 2012). La cantidad de mitocondrias estacionarias aumentó un 13% (Figura 10B), sin embargo el porcentaje de mitocondrias anterógradas y retrógradas no cambió significativamente con respecto a las proporciones observadas en el ratón control (Figura 10B). Las velocidades promedio de las mitocondrias tanto anterógradas como retrogradas no disminuyeron significativamente (Figura 10C) y la densidad de mitocondrias en  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  resultó similar a las de las neuronas control (Figura 10D). Otra de las cargas relevantes que kif5b está involucrado en mover es la vesícula de APP que debido a la alta tasa en la que es transportada tanto anterógrada como retrógradamente es ampliamente utilizada para medir dinámicas (Falzone et al, 2009). Para estudiar las dinámicas de APP en neuronas del ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , se realizaron transfecciones de los cultivos neuronales control y  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , con un plásmido que expresa APP fusionado con la proteína fluorescente YFP (APP-YFP). El porcentaje de vesículas de APP-YFP que se transportan en sentido anterógrado se vio reducido en un 17%, a la vez que se observaba un aumento del 20% de las vesículas estacionarias, mientras que el porcentaje de vesículas transportadas hacia el cuerpo celular no cambio por la caída en la expresión de kif5b (Figura 10F). Estos datos sugieren que un porcentaje de la población de vesículas anterógradas detuvo su transporte y se sumaron a la población estacionaria. Sin embargo la velocidad promedio de las vesículas de APP no se vio alterada en  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , manteniendo la misma velocidad que los controles tanto en transporte anterógrado como retrógrado (Figura 10G). Tampoco se observaron cambios en la densidad de las vesículas de APP transportadas en  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  comparadas contra el control (Figura 10H). Estos resultados muestran que la delección de kif5b disminuye el transporte axonal de APP y

de las mitocondrias pero no los detiene, sugiriendo que la función de otros motores moleculares también podrían participar en el movimiento axonal de estas cargas supliendo al menos parcialmente la deficiencia de kif5b mediante una redundancia de funciones.

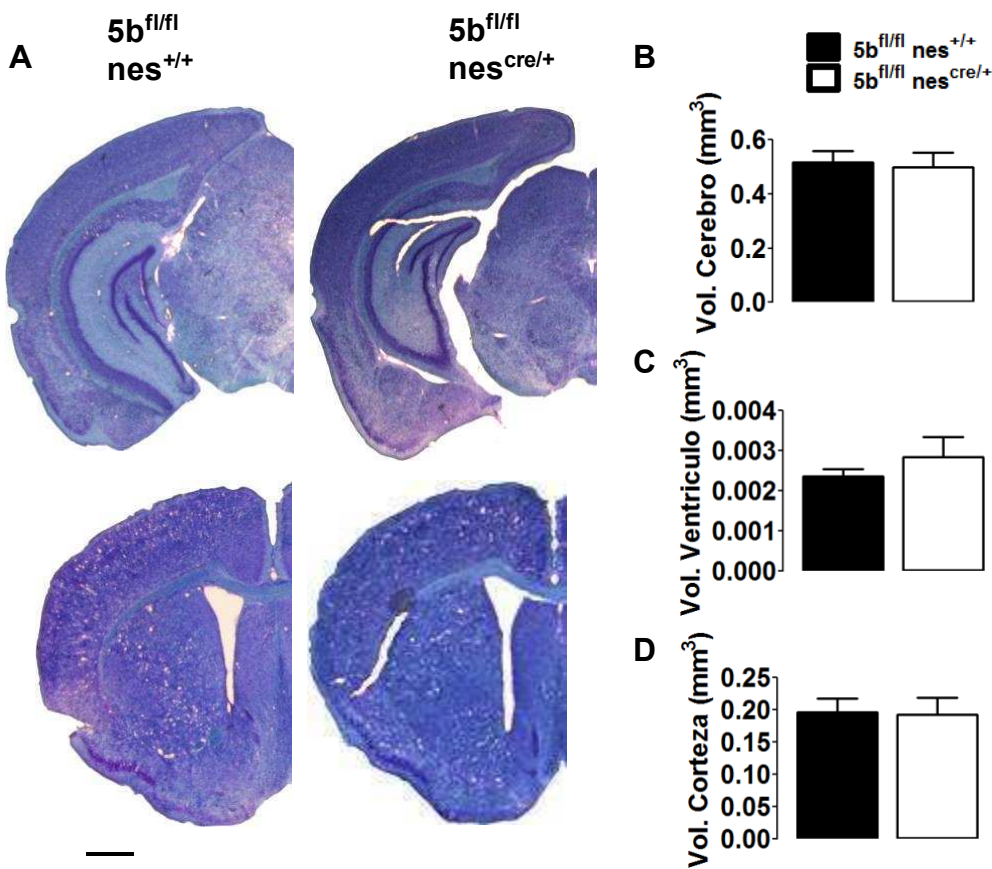


**Figura 10. El transporte de mitocondrias y de APP es alterado por la delección de kif5b.** Gráficos de movimiento de neuronas transfectadas con mito-gfp de ratones 5b<sup>fl/fl</sup> (izquierda) y 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup> (derecha) (A). La proporción de mitocondrias (B), velocidad de mitocondrias (C), densidad de mitocondrias (D) (n: 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/+</sup>=47, 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>=53 gráficos de movimiento). Gráficos de movimiento de neuronas transfectadas con app-yfp de ratones 5b<sup>fl/fl</sup> (izquierda) y 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup> (derecha) (E). La proporción de vesículas de app-yfp (F) velocidad de vesículas de app-yfp (G), densidad de vesículas de app-yfp (H) (n: 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/+</sup>=108, 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>=102 gráficos de movimiento). (\*p<0.05 test t) Escala 20μm

### **5.3 La delección de kif5b no altera el volumen ni la morfología del cerebro.**

Si bien aún se desconocen las funciones específicas de cada subunidad de las cadenas pesadas de kinesina se propone que la función del complejo motor Kinesina-1 es indispensable para un correcto desarrollo y funcionamiento neuronal. Alteraciones en estas funciones importantes determinan cambios significativos en los patrones de desarrollo neural que se manifiestan con alteraciones de la estructura cerebral (Winding et al, 2015). A su vez ratones con defectos en la expresión del motor molecular klc1 presentan defectos en el desarrollo del sistema nervioso (Saez et al, en preparación). Por su parte los ratones knockout de kif5a no presentan alteraciones histológicas en la estructura cerebral (Xia et al, 2003). Asimismo, los ratones deficientes de la cadena pesada kif5c, tampoco presentan cambios morfológicos en el cerebro aunque se ha descrito un menor tamaño general (Kanai et al, 2000). Por otro lado, la reducción de los niveles de expresión de Kinesina-1 en estadios tempranos de desarrollo neuronal genera claras alteraciones en la determinación axonal. Estos trabajos nos llevaron a evaluar cuales eran los efectos de la delección de kif5b neuronal en la formación de la arquitectura cerebral. Ratones  $5b^{fl/fl}$   $nes^{cre/+}$  de dos meses de edad fueron perfundidos y sus cerebros fueron procesados en cortes seriados de  $50\mu\text{m}$  (Figura 11). Tinciones con azul de toluidina fueron realizadas en cortes de cerebros de ratones control y  $5b^{fl/fl}$   $nes^{cre/+}$  para realizar un análisis volumétrico de las áreas totales del cerebro (Figura 11). La cuantificación de los volúmenes y estructuras nos permitió observar que la delección de  $Ki5fb$  no indujo cambios significativos en el tamaño total del cerebro (Figura11). Volúmenes similares fueron cuantificados en el análisis detallado de estructuras como

los ventrículos laterales y la corteza (Figura C y D). El análisis cualitativo de la estructura del hipocampo, giro dentado, CA1 y CA3 determinó la ausencia de diferencias significativas, contrario a lo observado previamente en la delección de la cadena liviana *klc1* del complejo Kinesina-1 (Falzone et al, 2009). Estos resultados sugieren que la delección de *kif5b* neural no altera los patrones de desarrollo, debido a la observación de una correcta morfología del cerebro en animales adultos *Kif5b*.



**Figura 11. La formación del cerebro no depende de la expresión de *kif5b*.** Tinción de azul de toluidina de cortes de cerebro de de 50 $\mu$ m ratones *kif5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/-</sup>* (izquierda) y *kif5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>* (derecha) (A). Se analizó el volumen total del cerebro (B), de los ventrículos (C) y de la corteza (D) ( $p > 0.05$  n=6 animales test t) Escala 1mm.

## **5.4 La delección neural de kif5b induce hipolocomoción y una descoordinación motora en el ratón $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ .**

La locomoción es regulada por un complejo circuito neuronal compuesto por los ganglios de la base. Modelos de animales knockout para los receptores dopaminérgicos D1 y D2 (Baik et al, 1994; Kelly et al, 1998; McDougall et al, 2005; Xu et al, 1994) presentaron defectos en la respuesta locomotora. Por otra parte, los receptores dopaminérgicos son transportados activamente (Aiso et al, 1987; van Der Kooy et al, 1986). Sin embargo aún no se ha estudiado si la delección de kif5b puede generar defectos en la locomoción. El campo abierto es un ensayo comportamental que permite evaluar el comportamiento no condicionado de los ratones, entre otros comportamientos, a la vez que ayuda a estudiar fenómenos más complejos como los niveles de ansiedad (Lipkind et al, 2004). Para conocer la función de kif5b en las respuestas locomotoras evaluamos la actividad exploratoria espontánea del ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  en un campo abierto durante 30 minutos (Figura 12). Los ratones fueron filmados para luego obtener y cuantificar las propiedades de movimiento mediante el programa Any-Maze. Durante este ensayo, los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  recorrieron una distancia 27% menor que los ratones control en los 30 minutos que duró el ensayo (Figura 12A), indicando un fenómeno de hipolocomoción. A su vez, en este mismo ensayo los animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presentaron una dificultad significativa para iniciar los eventos de movimiento lo cual se vio reflejado en un aumento del 40% del número de inicios de movimientos (Figura 12B). Debido a que una menor distancia recorrida por los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  podría estar asociada a fenómenos de habituación al contexto, se evaluó la escala temporal de la distancia recorrida por los animales en espacios de 5

minutos cada uno (Figura 12C). A los 20 y a los 30 minutos la distancia recorrida por el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  fue significativamente menor, sin embargo los valores de los ratones tendieron a ser menores en cada una de las ventanas temporales. Otro dato importante obtenido de este experimento es que los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  estuvieron un 50% menos de tiempo en movimiento en el centro del campo abierto y más tiempo en la periferia del mismo (Figura 12D), sugiriendo que el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  podría estar sufriendo trastornos en sus niveles de ansiedad o que el menor tiempo en el centro se deba a la hipolocomoción. Para ello, posteriormente los niveles de ansiedad fueron medidos en este animal.

Con la intención de determinar si la hipolocomoción y las fallas en la coordinación motora podrían ser producto de la descoordinación de los miembros durante el movimiento, se realizó un análisis del patrón de comportamiento de marcha. Para ello, se embebieron las patas de los ratones con tinta china negra y se los hizo caminar por una tira de papel secante, para que las huellas queden marcadas en el papel (Figura 12E). Luego se midió la distancia entre las huellas tanto derecha como izquierda de los miembros delanteros y traseros para determinar la distancia que se movieron los animales con cada paso. El análisis del patrón de marcha demostró que la distancia recorrida por cada miembro (Figura 12F), y en el conjunto de los miembros izquierdos y derechos (Figura 12G) no presentaban alteraciones o desbalances en la coordinación de los pasos.

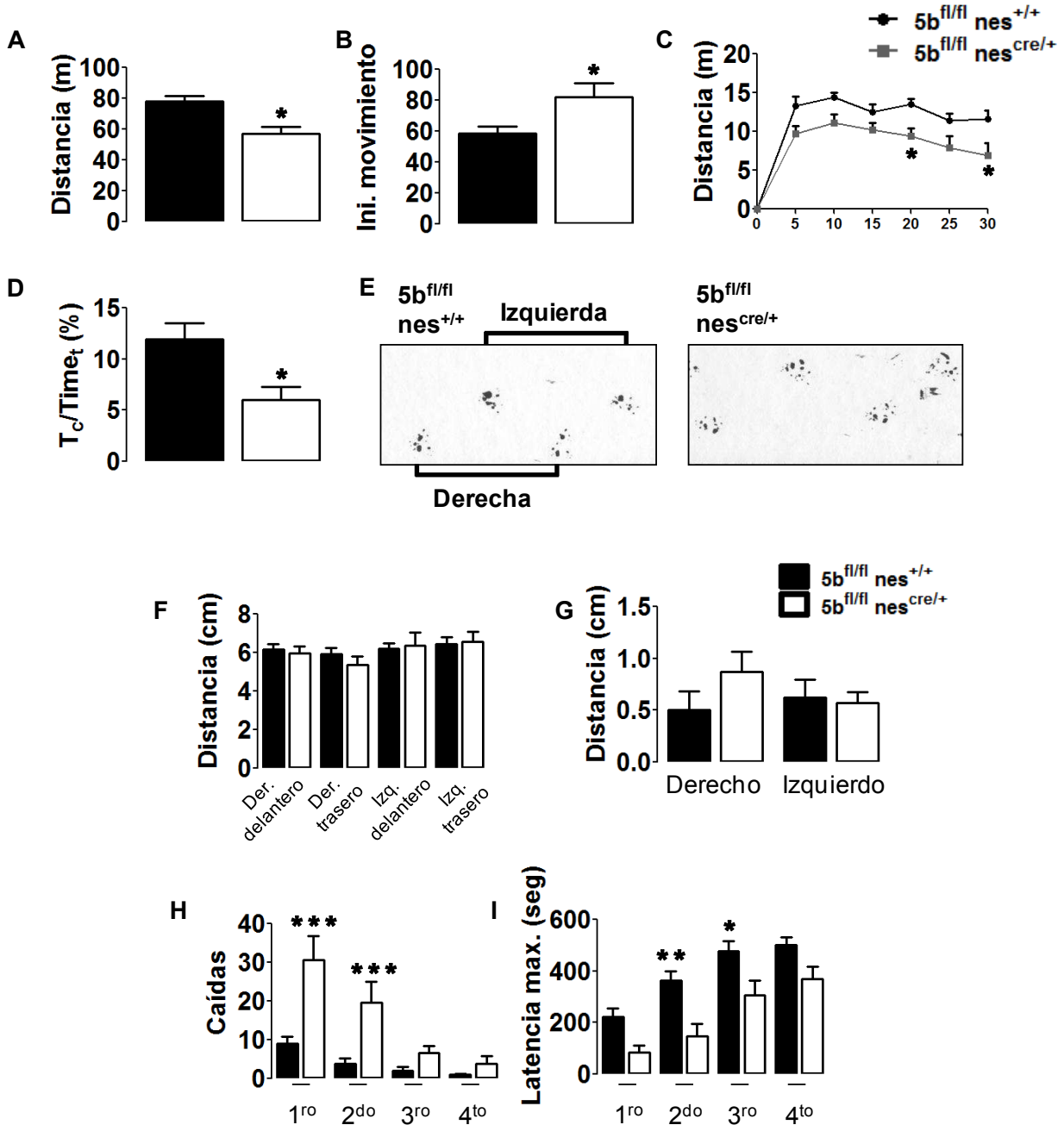
Debido a la hipolocomoción observada en los movimientos espontáneos exploratorios decidimos evaluar a los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  en respuestas motoras más complejas de fuerza y coordinación. Los animales fueron colocados en un rotarod, un rodillo que se

mueve a una velocidad constante de 14rpm (Figura 12H). El objetivo de este test fue evaluar la capacidad de los ratones para permanecer arriba del equipo realizando una coordinación motora más demandante. Los animales fueron entrenados durante 4 sesiones de diez minutos cada una, para evaluar la capacidad de coordinación inicial y a la vez estudiar si el entrenamiento puede mejorarla. En el rotarod los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  se cayeron inicialmente 3 veces más del rodillo en el entrenamiento 1 y hasta 5 veces más caídas en el entrenamiento 2 comparado contra el control, mostrando de esta manera un claro déficit de coordinación motora para llevar a cabo esta tarea (Figura 12H). También se contabilizó el tiempo máximo de permanencia entre caídas arriba del rodillo observando que los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presentaban un serio déficit en los diferentes ensayos (Figura 12I). Si bien durante el primer ensayo los ratones control y  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  no tuvieron diferencias en el tiempo máximo que estuvieron en el equipo, este tiempo fue significativamente menor en los ensayos 2 y 3 (60% y 35%) en los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  respectivamente. Sorprendentemente, a lo largo de las diferentes sesiones de entrenamiento los animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  mejoraron su rendimiento hasta obtener un número de caídas similar a los controles en los últimos dos ensayos (Figura 12E). Lo mismo pudo observarse en el tiempo máximo de permanencia el cual fue en aumento, hasta llegar a un máximo similar al control en la última sesión (Figura 12F).

Estos resultados nos permiten concluir que los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presentan un fenómeno de hipolocomoción en movimientos de exploración en campo abierto y también una descoordinación en la realización de movimientos más complejos en el rotarod, los cuales pueden ser mejorados mediante el entrenamiento. Sin embargo los



problemas de locomoción no se explican por habituación al contexto o por alteraciones en los patrones periféricos de movilización de los miembros durante el movimiento.



**Figura 12 Hip locomoción y descoordinación motora en el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ .** A-D Experimento de campo abierto: distancia total recorrida en 30 minutos medida en metros (A), número de inicios de movimiento (B) n: ratones  $5b^{fl/fl} nes^{+/+}$ =, 17 ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ =11 test de t, \* $p < 0.05$ , distancia recorrida cada 5 minutos \* $p < 0.05$  anova de dos vías, post test de Bonferroni (C), tiempo en movimiento en el centro en relación al tiempo en movimiento total (D). Análisis de la coordinación durante la locomoción: huellas dejadas sobre papel secante por los ratones (E), distancia recorrida por cada extremidad (F), distancia recorrida por las extremidades derecha e izquierda (G), (n:  $5b^{fl/fl} nes^{+/+}$ =9,  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ =8

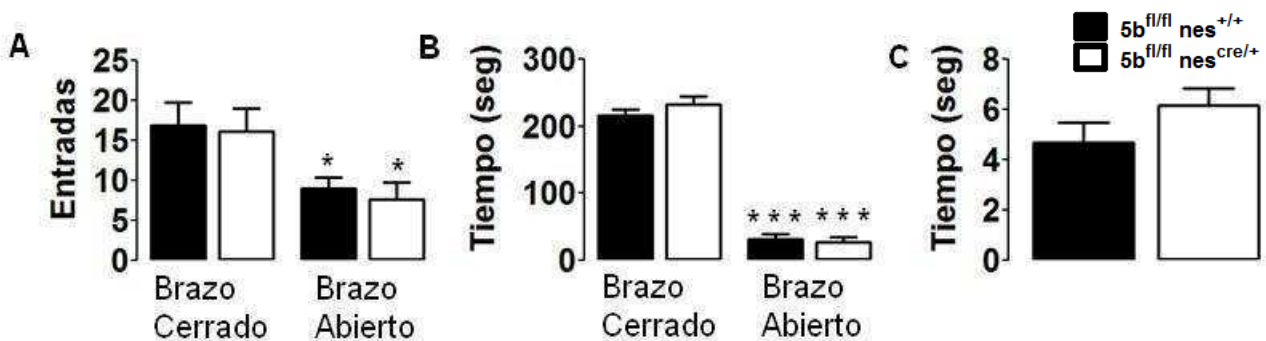
ratones  $p > 0.05$  test de t). Experimento de rotarod, 1<sup>ro</sup>, 2<sup>do</sup>, 3<sup>ro</sup> y 4<sup>to</sup> número de ensayo.: número de caídas (H), latencia máxima (I), (n:  $5b^{fl/fl} nes^{+/+} = 18$ ,  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+} = 11$  ratones  $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$  anova de dos vías, post test de Bonferroni).

## **5.5 Los ratones $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ no presentan alteraciones en sus niveles de ansiedad.**

Defectos en las respuestas exploratorias pueden deberse a alteraciones en los niveles de búsqueda de novedad o mecanismos de estrés o ansiedad que impiden un normal desplazamiento en el campo abierto (Lipkind et al, 2004). Los animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  pasaron menor tiempo en el centro del campo abierto, lo que podría estar relacionado con un aumento en los niveles de ansiedad. Para evaluar los niveles de ansiedad de los ratones, se realizó el ensayo del laberinto en cruz elevada que permite diseccionar la exploración con respecto a la ansiedad de un espacio abierto y elevado y ha sido validado mediante drogas ansiolíticas que modifican la respuesta sobre el laberinto en cruz (Lister, 1987). En este test los ratones control y  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  tuvieron un número similar y significativamente mayor de entradas a los brazos cerrados que a los abiertos lo que correlaciona con un mecanismo normal de mayor exploración en espacios protegidos (Figura 13A). También los animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  demostraron una permanencia significativamente mayor en los brazos cerrados que en los abiertos similar a los animales control (Figura 13B). El resultado fue similar en ambos genotipos, indicando que los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  no evidencian alteraciones significativas en los niveles de ansiedad comparados contra los controles y permiten proponer que los defectos observados previamente en el campo abierto se debe a alteraciones en la respuesta locomotora.

## 5.6 Los circuitos periféricos de dolor no están alterados por la delección de kif5b.

Alteraciones en las respuestas locomotoras pueden ser observadas como producto de mutaciones en proteínas motoras que alteran la sobrevivencia de neuronas motoras y sensoriales y que podrían inducir defectos indirectos en la tonicidad muscular o alteraciones de sensibilidad periférica (Hafezparast et al, 2003; Liu et al, 2015; Melemedjian et al, 2014; Puls et al, 2003; Su et al, 2013). Para testear si los animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presentan problemas de sensibilidad al dolor se realizó un test de plataforma caliente (Masocha et al, 2016). Los ratones fueron colocados en una plataforma de metal previamente calentada a 55 grados y se midió el tiempo de latencia hasta que los animales escapan de la plataforma (Figura 13). Los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  tuvieron una latencia a saltar fuera de la plataforma similar a los ratones control (Figura 13C). Estos resultados sugieren que los circuitos sensoriales y de respuesta motora que dependen del sistema de arco reflejo no presentan alteraciones en los animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  indicando que los diferentes tipos neuronales podrían tener diferente dependencia de la expresión de kif5b y que los circuitos de control motor central podrían ser los más afectados por su delección.



**Figura 13. Normal respuesta de los circuitos en los ratones knockout condicionales de kif5b. A-B** Laberinto en cruz elevada: número de entradas a los brazos abiertos y cerrados (A), tiempo en cada brazo (B), (n:  $5b^{fl/fl} nes^{+/+}=11$ ,  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}=8$  ratones  $***p<0.001$   $*p<0.05$  significancia contra condición control anova 2 vías post test de Bonferroni). Ensayo de plataforma caliente, tiempo que tardaron los ratones en saltar de la plataforma (C) (n:  $5b^{fl/fl} nes^{+/+}=16$ ,  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}=18$  ratones  $p>0.05$  test de t)

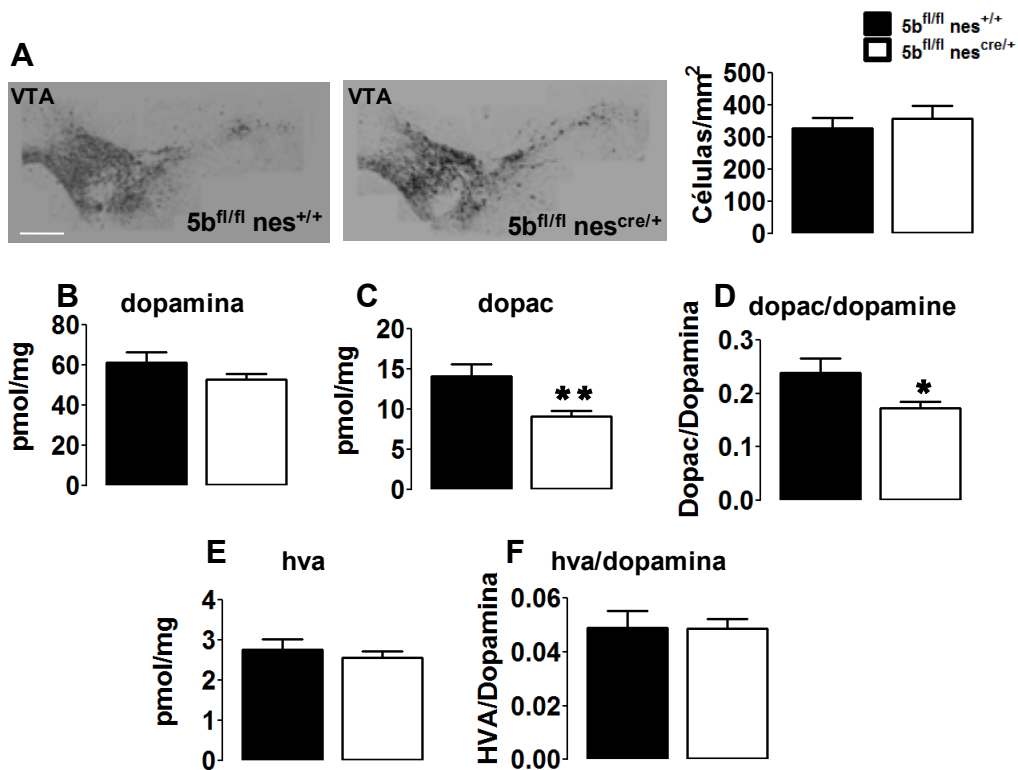
## **5.7 El metabolismo de la dopamina depende de la expresión de kif5b.**

En la enfermedad de Parkinson el fenotipo motor se hace evidente debido a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Estas alteraciones se alcanzan con una masiva muerte de más del 70% de las neuronas de la sustancia nigra (Shulman et al, 2011). Además, en humanos y modelos experimentales estos cambios están acompañados por un aumento de la actividad de los receptores dopaminérgicos postsinápticos en un intento de compensar la disminución en la estimulación de dopamina (Santini et al, 2008). Los animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presentaron defectos en la respuesta locomotora observada como hipolocomoción, aumento en los inicios de movimiento y descoordinación motora. Para evaluar la sobrevivencia de las neuronas de la sustancia nigra en los animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , se realizaron cortes al nivel del cerebro medio y posteriores inmunohistoquímicas contra la enzima TH, presente en las neuronas dopaminérgicas y responsable del paso limitante en la síntesis de la dopamina (Figura 14). Cortes seriados de cerebros de animales de 2 meses teñidos con TH fueron analizados en la región de la sustancia nigra según el atlas Paxinos Bregma: de -2.54mm a -3.46mm (Figura 14A). El área de la región de la sustancia nigra para cada corte fue medida y el número de neuronas TH positivas fue cuantificado. A los dos meses de edad los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presentaron la misma densidad de

neuronas TH positivas que los animales control, indicando que no hubo eventos de muerte neuronal (Figura 14A). En conjunto podemos suponer que las alteraciones motoras observadas no se deben a una muerte pronunciada de las neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el estriado. Sin embargo podrían existir defectos en la vía nigroestriatal sin muerte neuronal.

Fallas en la síntesis, liberación y degradación de la dopamina pueden inducir hipolocomoción y fallas en la coordinación motora sin la presencia de neurodegeneración dopaminérgica (Colebrooke et al., 2006). Para evaluar posibles alteraciones en estos mecanismos se obtuvieron animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  y control de 2 meses de edad para cuantificar la concentración del neurotransmisor dopamina y los metabolitos que se producen por degradación. Se realizaron disecciones del estriado, la región de mayor proyección dopaminérgica, de animales de ambos genotipos. Los estriados se homogenizaron, para realizar un ensayo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Figura 14B). Luego de las cuantificaciones pudimos observar que la concentración de dopamina de los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  fue similar a los ratones control (Figura 14B), sugiriendo que los animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  pueden alcanzar un nivel normal de producción de dopamina en concordancia con niveles similares de neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, cuando se evaluaron los niveles de dopac, el metabolito de dopamina obtenido de la degradación intracelular, se observó una reducción significativa del 40%, indicando una menor tasa de degradación de la dopamina recaptada (Figura 14C). Esto podría indicar que las neuronas dopaminérgicas de  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presentan una reducción en la degradación de dopamina de manera de compensar los niveles totales de dopamina. Otra posible explicación de los menores

niveles de dopac podría ser una menor recaptación de dopamina del espacio intersináptico, esto debería ser identificado al observar la degradación extracelular. La degradación extracelular de dopamina no se vio afectada, reflejándose en niveles similares del metabolito HVA en  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  comparado contra el control (Figura 14E). Esto elimina la idea de una menor recaptación, en concordancia con la hipolocomoción e indicaría que a pesar de que no hay neurodegeneración dopaminérgica, el metabolismo de la dopamina se ve alterado por la delección de kif5b.

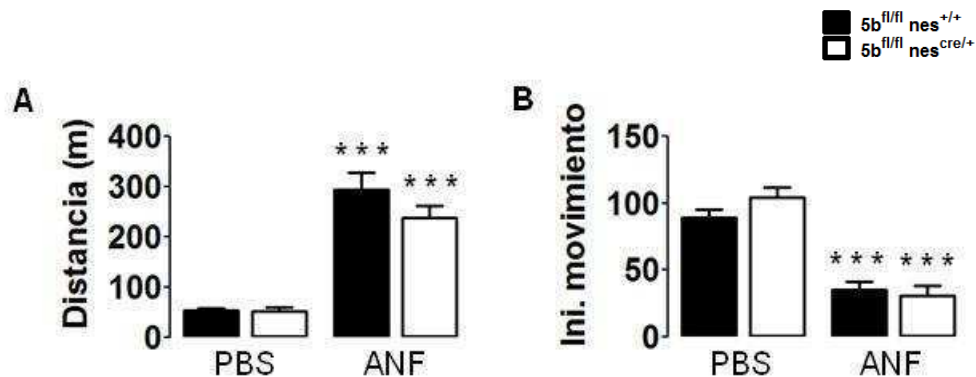


**Figura 14. Alteración del metabolismo dopaminérgico en animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$**  Inmunohistoquímica contra TH de cortes coronales de cerebro, densidad de células TH positivas  $5b^{fl/fl} nes^{+/+}$  (izquierda)  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  (derecha) (n:  $5b^{fl/fl} nes^{+/+}$ =16,  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ =9 ratones p>0.05 test de t) Escala 500 $\mu$ m (A). HPLC de homogenato de estriado, se detectaron los siguientes metabolitos: dopamina (B), dopac (C) y hva (E) (n:  $5b^{fl/fl} nes^{+/+}$ =10,  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ =9 \*p<0.05, \*\*p<0.01 test de t).

## **5.8 Los ratones $5b^{fl/fl}$ $nes^{cre/+}$ mejoran su capacidad motora en respuesta al aumento de la liberación dopaminérgica.**

Alteraciones en el metabolismo de la dopamina pueden no ser evidentes en el caso de disminuciones compensadas por cambios metabólicos (Perez et al, 2008). Una liberación masiva de las reservas de dopamina inducidas por drogas como la amfetamina podría desenmascarar alteraciones sutiles. Por lo tanto la respuesta motora de exploración en campo abierto fue evaluada en animales  $5b^{fl/fl}$   $nes^{cre/+}$  inyectados con una dosis de amfetamina (7.5mg/kg), que estimula la liberación de dopamina induciendo una respuesta de hiperlocomoción (Sharp et al, 1987). La inyección de amfetamina indujo un aumento significativo de la distancia recorrida en el campo abierto en los ratones  $5b^{fl/fl}$   $nes^{cre/+}$  (Figura 15A). Sorprendentemente, los ratones  $5b^{fl/fl}$   $nes^{cre/+}$  inyectados alcanzaron valores de distancia recorrida similares a los ratones control estimulados con amfetamina (Figura 15A). Es interesante destacar que la inyección de amfetamina en los animales control induce una facilitación del movimiento identificado por una reducción significativa de los eventos de inicio de movimiento comparado contra controles inyectados con PBS (Figura 15B). Los animales  $5b^{fl/fl}$   $nes^{cre/+}$  presentaban defectos en la iniciación de movimientos (Figura 12B) que aunque levemente mayor pierden significancia luego de la inyección previa de PBS (Figura 15B). Sin embargo, la estimulación de amfetamina induce una disminución significativa en el número de inicios de movimiento en el raton  $5b^{fl/fl}$   $nes^{cre/+}$  a niveles similares a los de ratones control (Figura 15B). Los resultados de estos experimentos nos permiten concluir que los animales  $5b^{fl/fl}$   $nes^{cre/+}$  presentan alteraciones en la vía nigroestriatal

que determina defectos locomotores, sin embargo, los defectos en las vías metabólicas de la dopamina inducidas por la delección de kif5b no serían suficientes para explicar los defectos motores debido a que se alcanza una normal respuesta hiperlocomotora bajo estimulación con anfetamina.



**Figura 15. El aumento en la liberación de dopamina mejora la locomoción de los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ .** Ensayo de campo abierto de 30 minutos en ratones inyectados con PBS y con anfetamina (ANF). Distancia recorrida en el campo abierto (A). Número de inicios de movimientos observados en el experimento (B). (n: PBS:  $5b^{fl/fl} nes^{+/+}$ =10,  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ =9; ANF: $5b^{fl/fl} nes^{+/+}$ =14,  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ =14 \*\*\* $p$ <0.001, significancia contra el tratamiento control. Anova 2 vías, post test de Bonferroni).

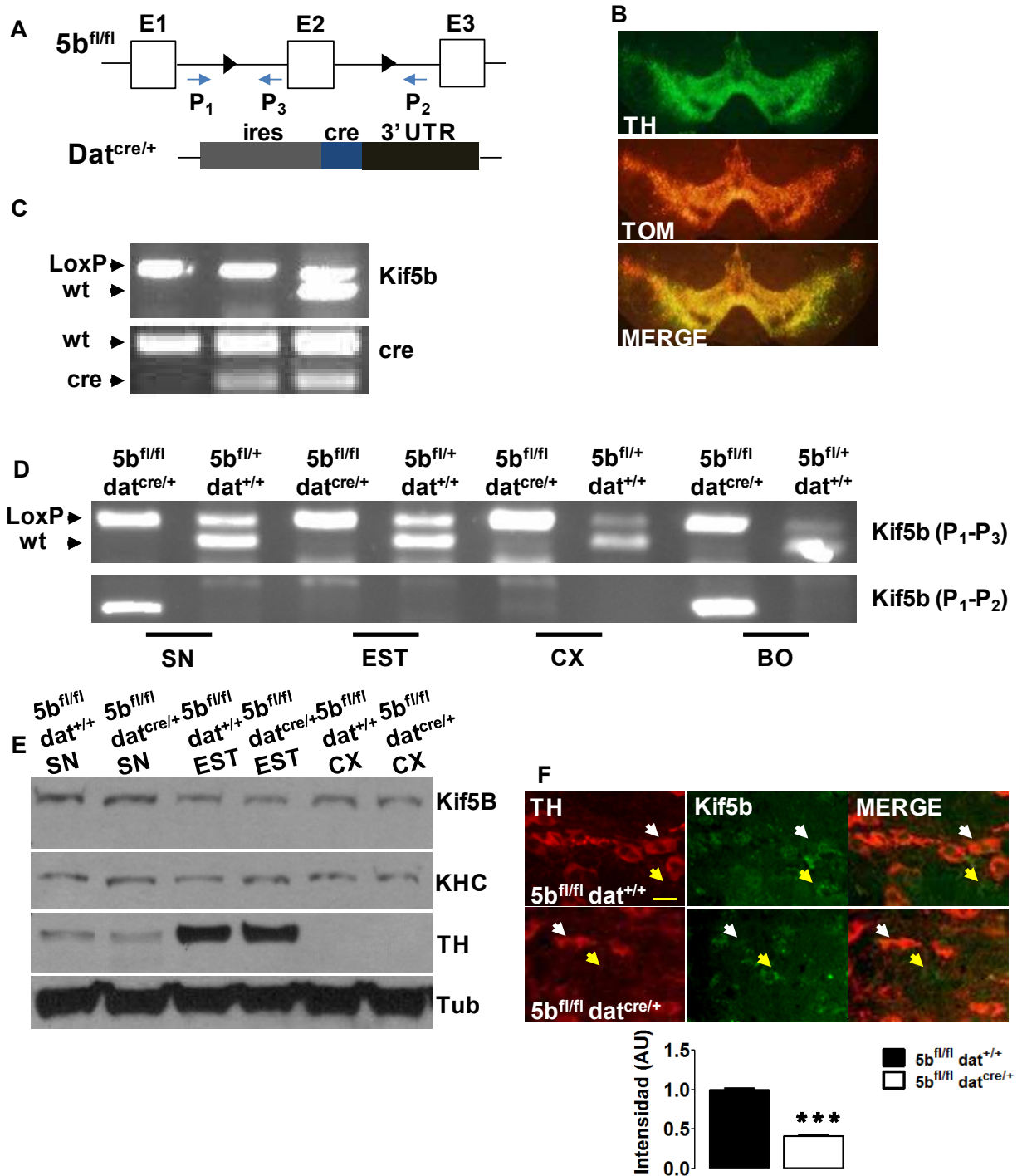
## **5.9 Desarrollo del ratón knockout condicional de kif5b en neuronas dopaminérgicas.**

Los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presentaron un déficit en la locomoción y en el metabolismo dopaminérgico. Sin embargo la delección de kif5b también ocurrió en las neuronas del estriado. Para evaluar si la hipolocomoción y los defectos en la coordinación motores observados en los animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  se debe únicamente a los defectos presinápticos en el metabolismo de la dopamina, se generó un ratón con delección de kif5b condicional selectivamente en neuronas dopaminérgicas. Para ello los ratones



5b<sup>fl/fl</sup> fueron cruzados con el ratón transgénico que expresa CRE bajo un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) dentro del gen del transportador de dopamina (DAT)  $dat^{cre/+}$  (Bäckman et al, 2006) (Figura 16A). La especificidad de la expresión de CRE en neuronas dopaminérgicas y su actividad enzimática fueron evaluadas cruzando el ratón  $dat^{cre/+}$  con el ratón reportero ai14. La recombinación del sitio stop en neuronas dopaminérgicas fue observada mediante la expresión de tomato y la colocalización con TH mediante la tinción con anticuerpos fluorescentes (Figura 16B). Esto demostró la expresión condicional de CRE específicamente en este tipo celular (Figura 16B). Posteriormente se realizó la cruce del  $dat^{cre/+}$  con los animales 5b<sup>fl/fl</sup> y para identificar los genotipos obtenidos luego del cruzamiento se realizó una estrategia de dos PCR en simultáneo, una para determinar la presencia de las secuencias Loxp (como fue llevado a cabo previamente para el ratón 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>) y otra para determinar la presencia del gen CRE bajo el sitio IRES utilizando 3 primers (Figura 16C). En nuestro esquema de cruzamiento se obtuvieron los siguientes ratones: control (5b<sup>fl/fl</sup>  $dat^{+/+}$ ), con 50% de recombinación del gen kif5b (5b<sup>fl/+</sup>  $dat^{cre/+}$ ) y con 100% de recombinación del gen (5b<sup>fl/fl</sup>  $dat^{cre/+}$ ), en neuronas dopaminérgicas. Para confirmar si se estaban produciendo eventos de recombinación en los animales 5b<sup>fl/+</sup>  $dat^{cre/+}$  se realizó una extracción de DNA del bulbo olfatorio, sustancia nigra, estriado y corteza. Utilizando los primers P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> se realizó una amplificación de PCR de modo de amplificar una banda de 219 pares de bases luego de un evento de recombinación ya que las secuencias de los primers se acercan (Figura 16D). De esta forma se pudo observar una banda específica solamente en el bulbo olfatorio y en la sustancia nigra, donde se encuentran los núcleos de las neuronas dopaminérgicas que expresan DAT y por consiguiente CRE

(Figura 16D). En cambio con el DNA del estriado y de la corteza no se amplificó ninguna banda (Figura 16D), indicando que no se habían producido los eventos de recombinación. Con la intención de evaluar la reducción de los niveles de kif5b se realizó un western blot de homogenato de sustancia nigra, estriado y de corteza (Figura 16E). Sin embargo, no se pudo observar una caída en la expresión de kif5b por que la expresión de kif5b en otros tipos neuronales y glia estaría enmascarando la reducción de la expresión en neuronas dopaminérgicas (Figura 16E). Para evaluar fehacientemente una caída en la expresión de kif5b de forma condicional en neuronas dopaminérgicas, realizamos colocalizaciones utilizando tinciones contra kif5b y TH por inmunofluorescencia en cortes de cerebro de ratón control y  $5b^{fl/+} \text{ dat}^{cre/+}$  en la sustancia nigra (Figura 16F). Se pudo observar una caída significativa de más del 50% de intensidad de fluorescencia en la expresión de kif5b en las neuronas dopaminérgicas de los ratones  $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{cre/+}$  mientras que en otras células no se observa esa caída (Figura 16F). Estos resultados nos permitieron validar el modelo y determinar que la caída condicional en la expresión de kif5b se daba únicamente las neuronas dopaminérgicas.



**Figura 16. Desarrollo del ratón knockout condicional de kif5b en neuronas dopaminérgicas.** Esquema del ratón  $5b^{fl/fl}$  (arriba) y del ratón  $dat^{cre/+}$  (abajo). Se diagramaron el sitio de reconocimiento interno del ribosoma (IRES, bloque gris), el gen cre (cre, bloque azul) y el 3' UTR del gen del transportador de dopamina (3' UTR, bloque negro) (A). Inmunofluorescencia contra TH de un corte de cerebro de ratón  $dat^{cre/+}$  ai14. Las neuronas TH (verde) colocalizan con la fluorescencia roja de la proteína tomato (B) PCR realizada para la genotipificación de los ratones. Los ratones que expresan CRE en heterocigosis tienen dos bandas, una a 264 pb y la otra a 152 pb (C). PCR de DNA extraído de

sustancia nigra (SN), estriado (EST), corteza (CX) y bulbo olfatorio (BO), con los primers P<sub>1</sub>-P<sub>3</sub> (arriba) y P<sub>1</sub>-P<sub>2</sub> (abajo). Se amplificó una banda con los primers P<sub>1</sub>-P<sub>2</sub> donde el exón 2 de kif5b se recombinó (D). Western blot de sustancia nigra (SN), estriado (EST) y corteza (CX) de ratones 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>+/+</sup> y 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup> (E). Coinmunofluorescencia de TH (rojo) y kif5b (verde). Célula dopaminérgica (flecha blanca), célula no dopaminérgica (flecha amarilla) (n: 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>+/+</sup>=32, 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup>=34 células \*\*\*p<0.001 test t) Escala 20µm (F).

## **5.10 La delección de kif5b en neuronas dopaminérgicas no genera defectos en la locomoción.**

La liberación de dopamina es fundamental para el correcto control motor y para la capacidad de llevar a cabo movimientos complejos. Los ratones 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup> mostraron hipolocomoción y fallas en la coordinación, a la vez que el degradación intracelular de la dopamina se encontraba disminuida. Para comprender si la delección de kif5b en neuronas dopaminérgicas es suficiente para generar defectos en la locomoción en los ratones 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup>, se estudió su locomoción en el ensayo de campo abierto y en el rotarod. Los ratones 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup> mostraron una normal distancia recorrida en el campo abierto a los 2 meses de edad alcanzando los niveles de los controles (Figura 17A), esto evidenció la falta de hipolocomoción en este animal. Además, en el ensayo de rotarod los ratones 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup> no mostraron ningún déficit en la coordinación motora comparados contra el control como si se había observado en los ratones 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup> (Figura 17B y 17C).

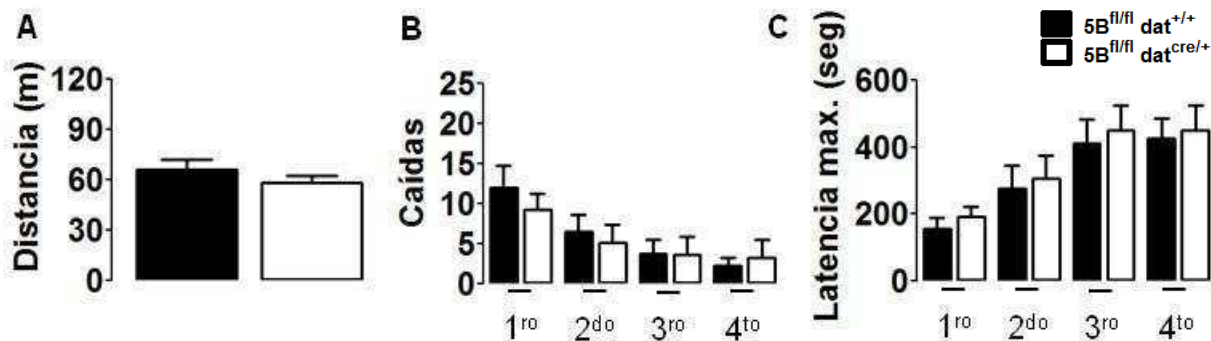


Figura 17. La delección de *kif5b* en neuronas dopaminérgicas no genera problemas de locomoción.

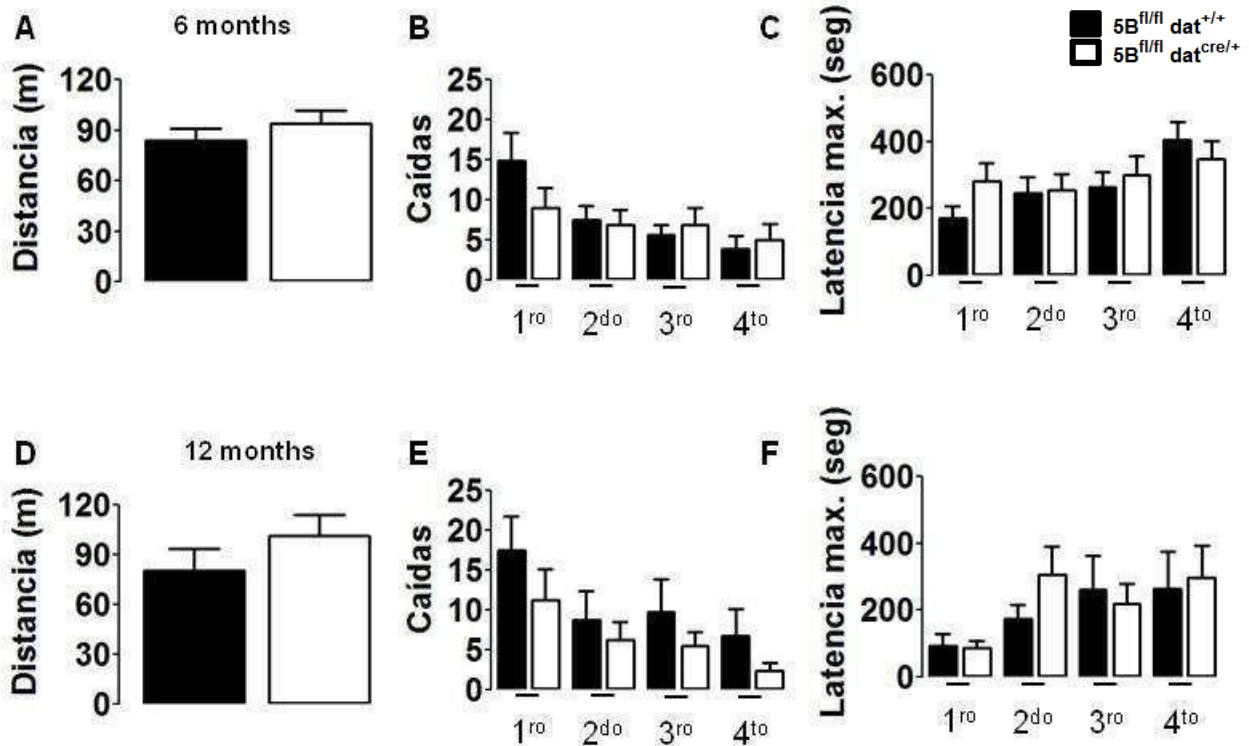
Distancia recorrida en el campo abierto 2 meses (n: 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>+/+</sup>=12, 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup>=10) (A) ( $p > 0.05$  test t).

Caídas en el rotarod (B) y mayor tiempo de permanencia (C) 1<sup>ro</sup>, 2<sup>do</sup>, 3<sup>ro</sup> y 4<sup>to</sup> número de ensayo. (n: 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>+/+</sup>=8, 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup>=8) ( $p > 0.05$ , anova de dos vías post test de Bonferroni).

### **5.11 La caída en la expresión de *kif5b* en las neuronas dopaminérgicas no genera defectos locomotores en ratones envejecidos.**

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que se hace presente con la edad. Por lo tanto es posible que la delección condicional de *kif5b* sólo en neuronas dopaminérgicas evolucionara más lentamente para poder generar defectos en la locomoción y en la coordinación motora. Para determinar posibles alteraciones a largo plazo que sean solo evidentes a nivel de respuesta motora como fue observado en los ratones 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>, evaluamos a los ratones 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup> en ensayos de campo abierto y rotarod a los 6 y a los 12 meses de edad. Los ratones 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup> de 6 meses de edad tampoco mostraron dificultades en sus respuesta motora en campo abierto recorriendo la misma distancia que los animales controles (Figura 18A). En el ensayo de rotarod a los 6 meses los animales 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup> demostraron una

performance similar a los controles con la misma cantidad de caídas a lo largo de los entrenamientos (Figura 18B), sugiriendo una normal coordinación motora. Posteriormente realizamos experimentos con animales envejecidos de 12 meses de edad donde pudimos observar resultados similares entre  $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{cre/+}$  y los ratones control en el campo abierto (Figura 18D) y en el rotarod (Figura 18E). Es importante destacar que la respuesta de coordinación motora de los animales envejecidos se vió empeorada levemente en ambos genotipos sin encontrarse diferencias entre  $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{cre/+}$  y control. En conclusión, la delección de kif5b condicional solo en neuronas dopaminérgicas no deteriora la capacidad motora y tampoco genera déficits de coordinación durante el envejecimiento de los ratones, sugiriendo que cualquier alteración presináptica observada por la eliminación de la función de Kif5b en neuronas dopaminérgicas no son suficientes para generar los defectos locomotores observados en el ratón  $5b^{fl/fl} \text{ nes}^{cre/+}$ .

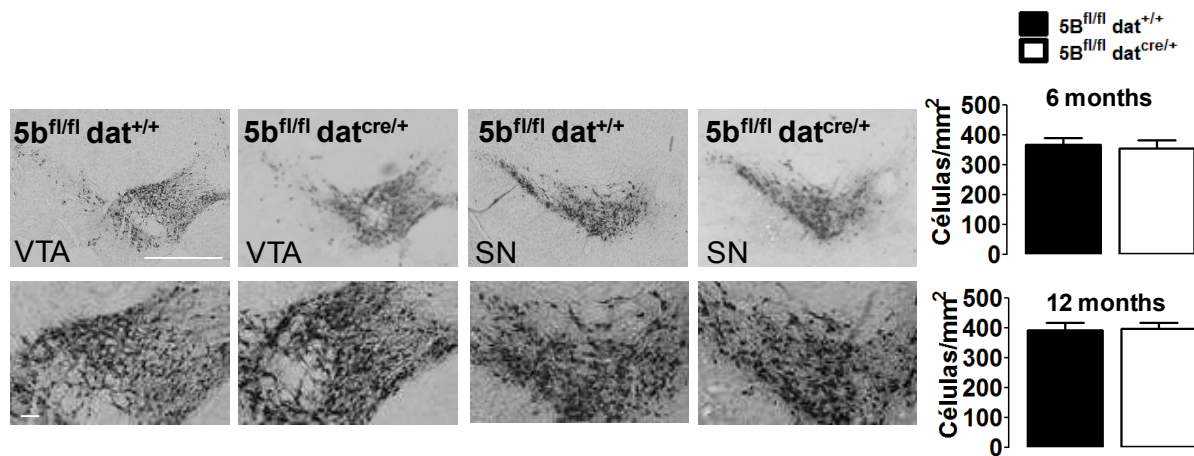


**Figura 18. La delección de kif5b en neuronas dopaminérgicas no genera problemas de locomoción en animales envejecidos.** Distancia recorrida en el campo abierto 6 meses (n: 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>+/+</sup>=13, 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup>=13) p>0.05 test t (A) Caídas en el rotarod (B) y mayor tiempo de permanencia (C) 6 meses (n: 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>+/+</sup>=13, 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup>=13)(p>0.05, anova de dos vías post test de Bonferroni). Distancia recorrida en el campo abierto 12 meses (n: 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>+/+</sup>=7, 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup>=7)(p>0.05 test t) (D). Caídas en el rotarod (E) y mayor tiempo de permanencia (F) 12 meses (n: 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>+/+</sup>=7, 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup>=7) (f) 1<sup>ro</sup>, 2<sup>do</sup>, 3<sup>ro</sup> y 4<sup>to</sup> número de ensayo. (p>0.05, anova de dos vías post test de Bonferroni).

## **5.12 La delección de kif5b en neuronas dopaminérgicas no disminuye su sobrevida.**

Los animales 5b<sup>fl/fl</sup> dat<sup>cre/+</sup> no presentaron alteraciones locomotoras a los 2 meses de edad y tampoco a los 6 y 12 meses. Sin embargo, las neuronas dopaminérgicas sin expresión de kif5b podrían ser más susceptibles al envejecimiento que las neuronas

control. Para responder esta hipótesis, se evaluó la densidad de neuronas que expresan TH de los ratones  $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{cre/+}$  a los 6 y a los 12 meses, con la intención de observar alteraciones a largo plazo. Cortes transversales de cerebro de animales control y  $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{cre/+}$  fueron realizados a la altura de la sustancia nigra y posteriormente tenidos con un anticuerpo contra TH para identificar las neuronas (Figura 19). La cuantificación estereológica de células TH positivas determinó que los animales  $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{cre/+}$  no presentaron cambios en la densidad de estas neuronas comparados contra los controles a pesar del envejecimiento de los animales, indicando que la delección de *kif5b* no induce la muerte de las neuronas TH positivas y que el envejecimiento no altera su sobrevivencia.

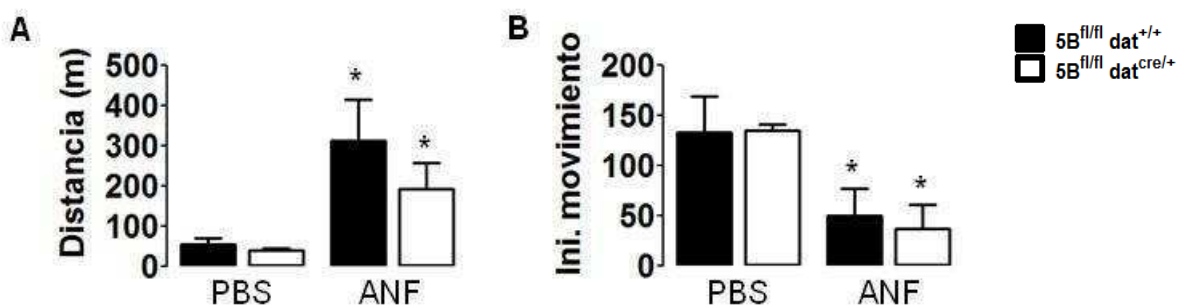


**Figura 19. Densidad de neuronas TH positivas de la sustancia nigra y de la VTA normal en ratones con delección de *kif5b* en neuronas dopaminérgicas.** Inmunohistoquímica de corte de cerebros de ratones de 12 meses de edad, de la zona de la VTA (izquierda) y de la SN (derecha) Escala 1mm (arriba) 50µm (abajo). Cuantificación de la densidad de neuronas dopaminérgicas a los 6 meses (n:  $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{+/+}$ =5,  $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{cre/+}$ =6) y a los 12 meses (n:  $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{+/+}$ =6,  $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{cre/+}$ =6) ( $p > 0.05$  test t).



### **5.13 Ratones $5b^{fl/fl}$ $dat^{cre/+}$ responden normalmente a la estimulación del sistema nigroestriatal mediada por anfetamina.**

Para evaluar la respuesta locomotora bajo una inducción de la liberación masiva de dopamina ensayamos a los animales  $5b^{fl/fl}$   $dat^{cre/+}$  en el campo abierto luego de la estimulación con anfetamina. Los animales recibieron una inyección (7.5mg/kg) intraperitoneal con PBS o anfetamina y 15 minutos después se evaluó la locomoción en el campo abierto. La estimulación con anfetamina generó un aumento significativo de la locomoción en los ratones control y  $5b^{fl/fl}$   $dat^{cre/+}$ , habiendo recorrido ambos genotipos la misma distancia (Figura 20A) y disminuyendo los niveles de inicio de movimiento (Figura 20B) de manera similar. Este experimento nos permite concluir que la deleción de  $kif5b$  en neuronas dopaminérgicas no perjudica significativamente el sistema nigroestriatal, pudiendo el animal responder en niveles fisiológicos y bajo situaciones de estimulación con anfetamina de manera similar a los animales control. Por lo tanto la hipolocomoción y la descoordinación motora observadas en los ratones  $5b^{fl/fl}$   $nes^{cre/+}$  no se pueden explicar únicamente por la deleción de  $kif5b$  en neuronas dopaminérgicas.



**Figura 20. La deleción de  $kif5b$  en neuronas dopaminérgicas no altera la respuesta a la estimulación con anfetamina.** Distancia recorrida control (PBS) y estimulación con anfetamina (ANF)

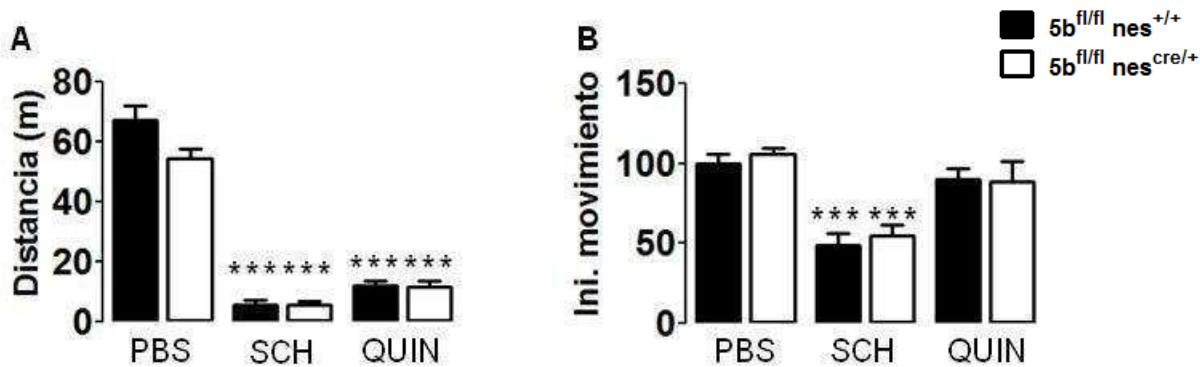
(A). Inicios de movimiento (B) (n:  $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{+/+}=2$ ,  $5b^{fl/fl} \text{ dat}^{cre/+}=4$ ,  $*p<0.05$  significancia contra la condición control. Anova 2 vías, post test de Bonferroni).

## **5.14 La activación de la vía indirecta se encuentra alterada en los ratones $5b^{fl/fl} \text{ nes}^{cre/+}$ .**

El inicio de los movimientos y la actividad motora dependen principalmente de una correcta activación de las vías directa e indirecta que controlan los circuitos motores corticales (Cui et al, 2013). Los defectos pre-sinápticos inducidos en los animales  $5b^{fl/fl} \text{ nes}^{cre/+}$  no parecen explicar de manera completa los defectos motores observados. Una alternativa podría estar en defectos post-sinápticos que sumados a los fenotipos presinápticos, alteren las respuestas motoras. La estimulación de la liberación de dopamina mediada por anfetamina hizo que los ratones  $5b^{fl/fl} \text{ nes}^{cre/+}$  consiguieran recorrer la misma distancia que los ratones control estimulados y disminuir sus inicios de movimiento. Sin embargo, la delección condicional de *kif5b* en neuronas dopaminérgicas no llevo a la generación de defectos motores. Estos resultados no logran explicar la hipolocomoción y las fallas en la coordinación motora observados previamente en los los ratones  $5b^{fl/fl} \text{ nes}^{cre/+}$ . Para determinar si los animales  $5b^{fl/fl} \text{ nes}^{cre/+}$  presentan alteraciones selectivas de las vías directa o indirecta se realizaron experimentos de respuesta locomotora luego de la inhibición o activación de receptores dopaminérgicos de manera diferencial. Inicialmente se realizaron inyecciones intraperitoneales con el antagonista de los receptores D1 *sch 23390* (0.25mg/kg), que inactiva selectivamente la vía directa induciendo una reducción de la locomoción. Los ratones  $5b^{fl/fl} \text{ nes}^{cre/+}$  disminuyeron significativamente la respuesta locomotora, viendo

disminuida la distancia recorrida en un 92% similar a lo observado en los ratones control (Figura 21A). Asimismo, la inhibición de la vía directa también generó una caída del número de inicios de movimiento del 54% en ambos genotipos a niveles similares (Figura 21B). Para evaluar posibles alteraciones de la vía indirecta, se inyectó intraperitonealmente un agonista de los receptores del tipo D2, quinpirole (0.05mg/kg), y se testearon los animales en el campo abierto. La activación de los receptores D2 también generó una disminución en la distancia recorrida de los ratones que llegó al mismo nivel en ambos genotipos (80%), tal cual como se había observado previamente con la inhibición de la vía directa (Figura 21A). Por otra parte, en este caso el número de inicios de movimiento no se vio afectado por la activación de la vía indirecta, observándose valores similares en ambos genotipos (Figura 21B).

La inhibición de la vía directa llevó a un aumento de la hipolocomoción y a la disminución del número de inicio de movimiento. Por el contrario, la activación de la vía indirecta disminuyó la distancia recorrida sin alterar los inicios de movimiento. El agonista de los receptores D1, SKF 38393 no se utilizó debido a que su inyección intraperitoneal no generaba cambios en la locomoción de los ratones (Starr & Starr, 1986). Por su parte el antagonismo de los receptores D2 con risperidona tampoco tenía efectos sobre la locomoción, aunque si se observa una disminución en la distancia recorrida con una previa estimulación mediada por drogas (Su et al., 2007). Los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  y los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{+/+}$  tuvieron la misma respuesta sin permitirnos concluir si alguna de estas vías está afectada o no.



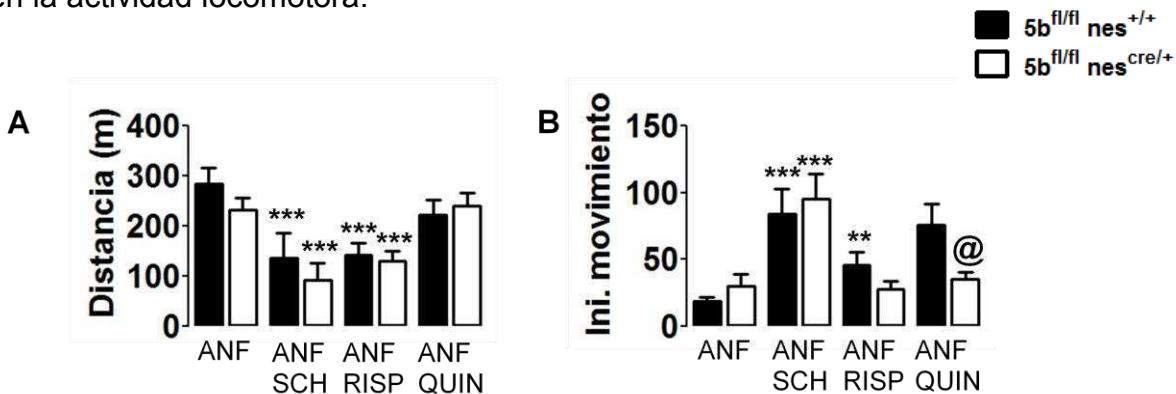
**Figura 21. Respuesta farmacológica normal de las neuronas GABAérgicas del estriado en los ratones 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>.** Ensayo de campo abierto en ratones inyectados con PBS, sch 23390 (SCH) o quinpirole (QUIN). Distancia recorrida por los ratones durante el ensayo (A). Número de inicios de movimiento en el ensayo (B). (PBS n: 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/-</sup>=13, 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>=22; SCH n: 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/-</sup>=7, 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>=11; QUIN n: 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/-</sup>=6, 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>=12) (\*\*\*)p>0.001significancia contra la condición control. Anova de 2 vías post test de Bonferroni).

En condiciones fisiológicas de liberación de dopamina, los animales 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup> y los 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/-</sup> respondieron de forma similar a la estimulación de los receptores D2 y a la inhibición de los receptores D1. Sin embargo, es posible que la inhibición de la vía directa y la activación de la vía indirecta generen una hipolocomoción tan significativa que enmascare diferencias sutiles en la actividad de ambas vías. Por lo tanto diseñamos experimentos de inhibición de los receptores dopaminérgicos luego de la estimulación dopaminérgica con anfetamina. Los ratones fueron inyectados con sch 23390 (0.25mg/kg) y 15 minutos después, con anfetamina (7.5mg/kg) para estimular la liberación de dopamina. En el campo abierto, observamos que los animales 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup> presentaron una disminución significativa de un 55% de la distancia recorrida similar al control comparando con la estimulación con anfetamina sola (Figura 22A). Además, observamos que ambos genotipos incrementaron 3 veces el número de inicios de movimiento comparado contra anfetamina sola (Figura 22B), sugiriendo que

la inhibición de los receptores D1 bajo estimulación de dopamina incrementan la respuesta de inicios de movimiento. En este ensayo los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  respondieron de forma similar a los controles sugiriendo que la delección de kif5b no perjudica la actividad de la vía directa.

Para evaluar si la inhibición de la vía indirecta se encuentra impedida en los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , se realizó una inyección con un antagonista de los receptores del tipo D2, risperidona (0.025 mg/kg), seguida de una inyección con anfetamina. Se observó una disminución significativa de un 30% de la distancia recorrida en el campo abierto comparado contra anfetamina sola, en ambos genotipos (Figura 22A). Sin embargo, se indujo un aumento significativo en el número de inicio de movimiento en los ratones control, el cual no fue observado en los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  (Figura 22B). Este resultado remarca que la actividad de la vía indirecta también es necesaria para facilitar el inicio de movimiento y además que la delección de kif5b induce alteraciones selectivas en esta vía. Otra forma de evaluar la activación de la vía indirecta se realizó mediante la inyección de un agonista de los receptores D2, quinpirole (0.05mg/kg), previo a la estimulación con anfetamina. La distancia recorrida por los ratones control y los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  no disminuyó a pesar de la inyección con quinpirole (Figura 22A). Sin embargo la activación de la vía indirecta generó que los ratones control aumentaran los inicios de movimiento mientras que, sorprendentemente, los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  mantuvieron bajos los valores de inicios de movimientos tal como había sido observado con anfetamina sola (Figura 22B). Estos resultados sugieren que el raton  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presenta alteraciones específicas en la actividad de la vía indirecta que depende de la activación o inhibición de los receptores dopaminérgicos de tipo D2

y que finalmente controlan el desarrollo normal de los eventos de inicio de movimiento en la actividad locomotora.



**Figura 22. La actividad de la vía indirecta del estriado depende de la expresión de kif5b.** Ensayo de campo abierto en ratones inyectados con anfetamina (ANF), anfetamina y sch 23390 (ANF SCH), anfetamina y risperidona (ANF RISP) o anfetamina y quinpirole (ANF QUIN). Distancia recorrida por los ratones durante el ensayo (A). Número de inicios de movimiento en el ensayo (B). (ANF n: 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/+</sup>=15, 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>=15; ANF SCH n: 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/+</sup>=9, 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>=10; ANF RISP n: 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/+</sup>=13, 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>=14; ANF QUIN n: 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/+</sup>=8, 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup>=10 (\*\*\*)p>0.001, \*\*p>0.01 significancia contra la condición control, @ p<0.001 significancia contra el animal 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>+/+</sup>. Anova de 2 vías post test de Bonferroni).

### 5.15 Los ratones 5b<sup>fl/fl</sup> nes<sup>cre/+</sup> tienen menor nivel del receptor D2 en la membrana plasmática de la sinápsis

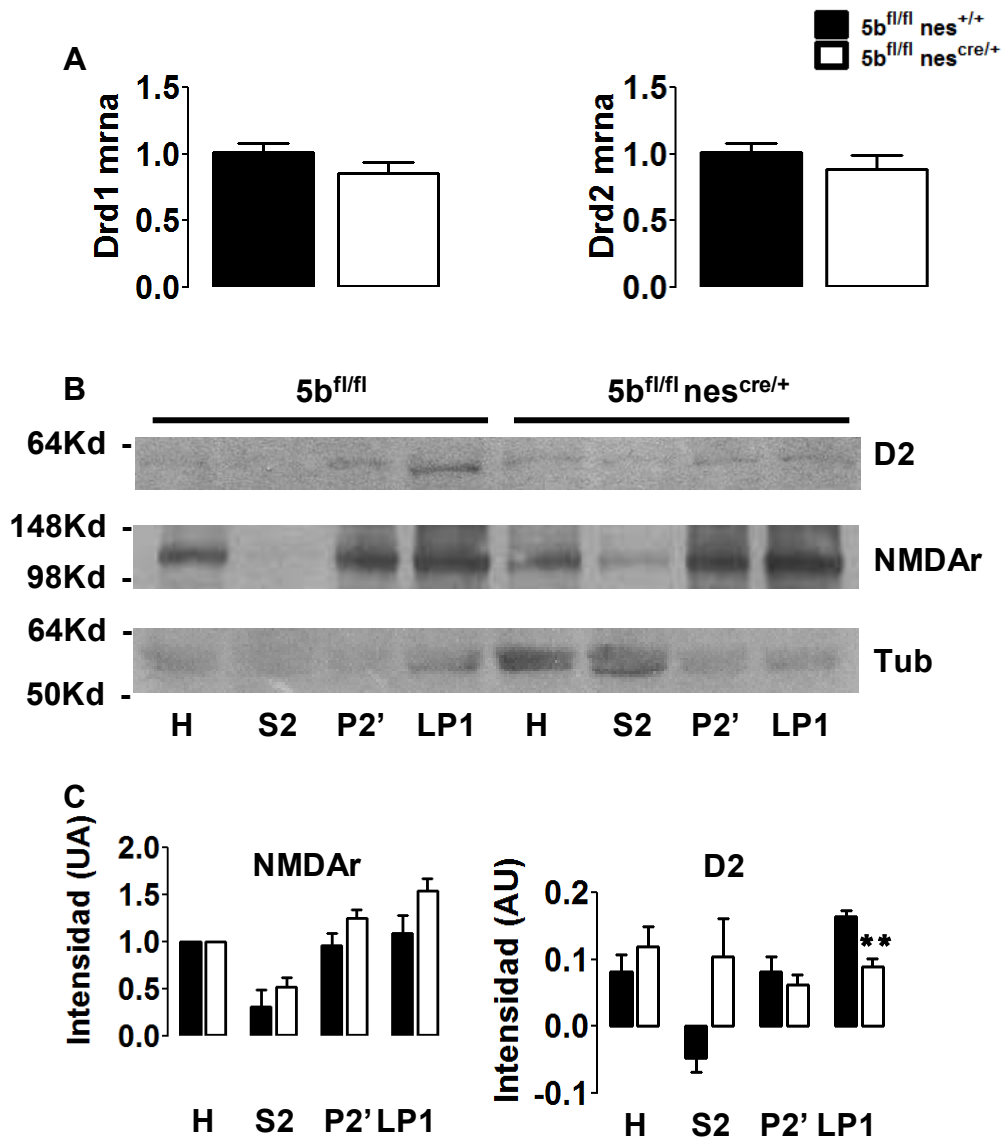
Defectos en la activación de la vía indirecta podrían deberse a una reducción en la expresión del receptor D2 en el estriado. Para ello evaluamos los niveles de expresión de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 mediante PCR en tiempo real a partir de RNA mensajero obtenido de estriado. El estriado fue disecado, para extraer el RNA mensajero. Se realizó una transcripción reversa para generar el cDNA a partir del cual se llevó a cabo una PCR en tiempo real. Esta PCR nos permitió evaluar la concentración de mensajero de los receptores D1 y D2 comparándolos con un mensajero control que tiene una concentración constante en los distintos tipos celulares

(ciclofilina). La PCR en tiempo real determinó que los niveles del receptor D1 y D2 de los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  son similares a los controles (Figura 23A), sugiriendo que los niveles de expresión de los receptores dopaminérgicos no están alterados en animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  luego de la delección génica de *kif5b*.

A pesar de que los niveles de mensajero fueron similares, defectos en la distribución de los receptores por la falta de un motor molecular, pueden llevar a una activación defectuosa de la vía indirecta. Para responder esta pregunta realizamos un ensayo de fraccionamiento subcelular a partir de estriado de manera de evaluar los niveles de proteínas de membrana y de los receptores de tipo D2 en el estriado (Figura 23B). Se disecó el estriado de los ratones y el homogenato obtenido se pasó por una serie de centrifugaciones para poder fraccionar los distintos compartimentos celulares (Abe et al, 2009). Se corrió un gel de poliacrilamida con las siguientes fracciones: el homogenato obtenido de los estriados (H), la fracción S2 que contiene el citosol, la fracción P'2, compuesta por membrana plasmática cruda y finalmente la fracción Lp1 enriquecida en membranas plasmática de la sinápsis. El gel obtenido fue revelado con anticuerpos que marcaron el receptor NMDAr (Figura 23B) el cual se encuentra en membranas postsinápticas y nos ayudó a determinar la calidad del fraccionamiento. También se utilizó el anticuerpo contra tubulina para marcar las fracciones que contenían proteínas citoplasmáticas. Debido a la escases de material inicial estos geles fueron especialmente direccionados a evaluar los receptores dopaminérgicos de tipo D2 ya que son los reguladores de la vía indirecta afectada en los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ . Niveles similares del receptor D2 fueron observados en los homogenatos de estriado de los animales  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  y controles indicando nuevamente que no existe una

reducción en los niveles de expresión de D2 (Figura 23C). La fracción Lp1 que contiene la membrana plasmática de la sinápsis, se enriqueció en el receptor D2 en los ratones control, indicando que el receptor es presentado correctamente en la post-sinapsis. Sin embargo, los ratones con  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  no mostraron un enriquecimiento significativo del receptor D2 en esta fracción de membrana (Figura 23C). Este resultado sugiere que los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  podrían presentar una reducción de la función de D2 en la vía indirecta por una disminución en su localización en la membrana plasmática de la sinápsis. Además, comparando las fracciones citosólicas de D2 se observa un enriquecimiento mayor en  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  comparado contra el control, donde se observa una disminución, indicando una alteración en la distribución y en la presentación del receptor en membranas sinápticas. Estos resultados permiten sugerir una nueva función del motor molecular kif5b en el transporte o presentación dendrítica del receptor D2 que cuando está ausente puede inducir defectos en la respuesta locomotora induciendo hipolocomoción y descoordinación motora.





**Figura 23. Menor nivel del receptor D2 en la membrana plasmática sináptica de los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ .** Niveles de RNA mensajero del receptor D1 (izquierda) y del receptor D2 (derecha) cuantificados mediante RT-PCR (n:  $5b^{fl/fl} nes^{+/+}$ =8,  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ =7  $p>0.05$  test de t) (A). Western blot representativo de un fraccionamiento subcelular realizado a partir de estriado. Se corrieron las muestras correspondientes a: homogenato (H), sobrenadante 2 (S2), pellet 2' (P2') y la fracción LP1 (B). Cuantificación de la concentración del receptor NMDAr usado como control de la eficiencia del fraccionamiento (izquierda) y del receptor D2 (derecha) n=3 \*\* $p<0.01$  test de t) (C)

# 6. Discusión

El objetivo de este trabajo de tesis doctoral fue determinar el rol que tiene kif5b en el sistema nervioso y más precisamente en los circuitos neuronales centrales de control motor. Para cumplir este objetivo se generaron diferentes animales deficientes condicionales en la expresión del motor molecular kif5b. Un modelo incluyó la delección de Kif5b en el sistema nervioso, y el otro la delección específica de kif5b en neuronas dopaminérgicas. La caracterización de estos dos modelos animales nos permitió plantear un rol para el motor molecular kif5b en el metabolismo de la dopamina y en la distribución y presentación de los receptores dopaminérgicos Drd2.

## **6.1 El transporte intracelular en la formación de la estructura del sistema nervioso.**

El transporte axonal es un sistema fundamental que asegura el establecimiento de la polaridad neuronal, ayuda a la polimerización de microtúbulos, la definición de la identidad axonal de la neurona en desarrollo y es indispensable para un normal metabolismo neuronal. Principalmente los motores de kinesina han sido descritos como moléculas imprescindibles en la extensión neurítica y la identificación axonal (Jacobson et al, 2006; Yamamoto et al, 2012). Alteraciones en las funciones de kinesina llevan a defectos en la polaridad y el correcto desarrollo de las estructuras del sistema nervioso. Además, fallas en diferentes componentes, ya sea de motores, estabilidad de microtúbulos o cargas, han sido vinculados con el inicio o el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (De vos 2008, Stokin & Goldstein 2006). Muchos trabajos han estudiado el rol del motor molecular kinesina-1 en el sistema nervioso y se

han generado numerosos modelos de ratones transgénicos con este fin (Falzone et al, 2009; Xia et al, 2003; Tanaka et al, 1998). En esta Tesis se caracterizó el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , el cual interrumpe la expresión de kif5b en el sistema nervioso. Es importante remarcar que la delección ubicua del gen de kif5b es letal (Tanaka et al 1998), sin embargo la muerte de estos ratones ocurre en el día 11.5 postnatal. En cambio, los mutantes del motor molecular kif5a mueren en el día embrionario 18.5, teniendo las crías (extraídas por cesárea) problemas en su respiración (Xia et al., 2003). Es interesante remarcar que los cerebros de los ratones mutantes de kif5a no tienen diferencias estructurales significativas con sus pares control, aunque se ha observado un mayor tamaño de motoneuronas (Xia et al, 2003). Por otra parte los ratones mutantes de kif5c no tiene un fenotipo aparente, sin embargo los cerebros del ratón knockout presentan un menor tamaño con respecto al control (Kanai et al, 2000). Si bien el mutante ubicuo es letal, el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  que hemos generado es viable, tiene capacidad de reproducción y la arquitectura general del cerebro es normal tanto en forma como en tamaño y no se observan signos claros de presencia de axonopatías. Esto último es importante señalarlo porque la delección de la subunidad liviana KLC1 del motor kinesina-1 conlleva a una deformación estructural de diferentes áreas del cerebro como anomalías en la formación del hipocampo y a una disminución de los tractos axonales centrales y periféricos que incluyen una reducción cuerpo calloso (Falzone et al, 2009). Estos defectos en KLC1, que no son observados en  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , hasta llegan a comprometer la sobrevivencia neuronal ya que presentan un menor número de motoneuronas y una menor densidad de la sustancia blanca de la médula espinal, fenotipos no observados en los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ . Es interesante entonces

remarcar que la delección de las distintas subunidades del motor kinesina-1 lleva aparejados diferentes fenotipos. Algunos con mayor implicancia en el desarrollo neural y otros con menos. Estos trabajos ponen en relieve la proposición de que hay determinadas funciones de kif5a, kif5b y kif5c que podrían ser redundantes en el sistema nervioso y no así en otros tipos celulares. Finalmente podemos remarcar que la delección de kif5b en el sistema nervioso central no es letal ni genera alteraciones significativas de la formación de las estructuras del cerebro sugiriendo que su función, al menos parcialmente podría estar siendo reemplazada por otros motores de cadenas pesadas. Como hemos demostrado, este remplazo sería funcional y no de expresión ya que no observamos cambios significativos en la expresión de los motores kif5a o kif5c en el animal  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ . Así como no son observadas en los ratones knockout de kif5a y de kif5c no deberíamos esperar la aparición de axonopatías en el cerebro del ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , aunque habría que evaluar que ocurre durante el envejecimiento y la formación de agregados proteicos.

Diferentes alteraciones estructurales y neurodegeneración también han sido descritos en animales con delección de motores de dineína. El transporte axonal de cargas en sentido retrógrado también es fundamental y debe estar coordinado con el transporte anterógrado. La delección del motor molecular DHC es letal (Harada et al, 1998), y los ratones mueren en el día embrionario 8.5. La caracterización de dos mutaciones de DHC en ratones (Loa y cra1) (Hafezparast et al, 2003), demostraron la relevancia que tiene la expresión de DHC en las motoneuronas. La mutación loa es un intercambio de la timina 580 por una adenina, la mutación cra1 es un intercambio de la base adenina 1055 por una guanina. Ambos ratones mutantes mostraron neurodegeneración de las

motoneuronas e inclusiones similares a cuerpos de Lewy en las neuronas sobrevivientes. No solamente DHC es importante para las motoneuronas sino que la función de dineína-dinactina es fundamental (Teuling et al, 2008), ya que defectos en esa función genera ensanchamientos axonales, fragmentación del aparato de Golgi y una reducción del transporte retrógrado, sin embargo no se observaron eventos de neurodegeneración. Estas mutaciones de DHC se han utilizado como modelos para estudiar la esclerosis lateral amiotrófica que afecta principalmente a las motoneuronas y genera defectos en la locomoción. Sin embargo los ratones  $kif5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  tuvieron la capacidad de alcanzar la distancias recorridas y disminuir el número de inicios de movimiento a niveles similares a los observados en los ratones control, a través de la estimulación de la liberación de dopamina y los análisis de respuesta de comportamientos de arco reflejo no evidenciaron problemas periféricos. Por lo tanto estos resultados estarían sugiriendo que, contrario a lo observado en los mutantes de DHC, la delección de  $kif5b$  no estaría afectando la actividad de las motoneuronas.

No solamente defectos en la expresión de motores moleculares pueden llevar a la generación de enfermedades neurodegenerativas. Las proteínas MAPs que estabilizan los microtúbulos son fundamentales para el correcto funcionamiento del transporte intracelular. El ratón que expresa la mutación de tau humana K369I, que está vinculada a la generación de la demencia frontotemporal (Ittner et al, 2008) se caracteriza histológicamente por tener agregados de tau y por la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, la cual no se observó en el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ . A pesar de ello, ambos mutantes presentaron dificultades en la locomoción, aunque diferentes. Mientras el ratón K369I presentaba dificultades durante el

movimiento, los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  no tuvieron defectos en coordinación de marcha y la distancia de los pasos. Además, a diferencia del ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , con el envejecimiento los ratones K369I tuvieron eventos de neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas. Estos resultados evidencian que las neuronas dopaminérgicas son más sensibles a la alteración de la proteína tau que a la delección de Kif5b.

## **6.2 Mecanismos moleculares afectados por la delección de kif5b.**

Las cadenas pesadas de kinesina son las encargadas de generar la tracción sobre microtúbulos en el transporte de un gran número de cargas, incluyendo la vesícula de APP (Kamal et al, 2000), mitocondrias (Tanaka et al, 1998), receptores GABA (Twelvetrees et al, 2010) y el complejo de degradación proteasoma (Otero et al, 2014). En el trabajo de Tanaka se observó la acumulación perinuclear de mitocondrias en fibroblastos del ratón knockout sistémico de kif5B. Sin embargo el ratón knockout de KLC1 no presentó defectos tempranos en las dinámicas de transporte mitocondrial debido a que la interacción con la cadena pesada de kinesina se da a través de miro y no de KLC1 (Falzone et al, 2009). Posteriormente este animal si desarrolla acumulaciones de mitocondrias en los ensanchamientos axonales (Falzone et al, 2009). En el caso del ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  encontramos que las dinámicas de transporte mitocondrial se vieron levemente alteradas, con un aumento significativo de la proporción de las mitocondrias estacionarias, sin cambio en las velocidades. Estos

resultados indican que en neuronas la cadena pesada Kif5b no sería la única subunidad encargada de transportar mitocondrias a lo largo del axón. Aunque en otros tipos celulares como es el caso de los fibroblastos parecería ser fundamental (Tanaka et al, 1998).

Otra de las cargas que ha sido descrita como dependiente significativamente del complejo Kinesina-1 es la vesícula de APP. Diferentes trabajos proponen mecanismos encontrados acerca de cómo se produce la asociación de esta vesícula con el motor kinesina-1. En neuronas de hipocampo de  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  el análisis de las dinámicas de transporte axonal de APP dio como resultado una disminución de la proporción de vesículas anterógradas y un aumento de las vesículas de APP estacionarias, sin observarse cambios significativos en las velocidades. Las dinámicas de transporte de APP en neuronas del ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  son muy diferentes a las del ratón knockout de KLC1. Además de que en  $KLC1^{-/-}$  se indujo una alteración significativa de las proporciones de movimiento anterógradas y retrógradas, también, las velocidades de transporte anterógrado y retrógrado disminuyeron en el ratón KLC1 knockout y no lo hicieron en el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ . Se puede pensar que la delección de  $kif5b$  no afecta la interacción que tiene APP con el motor, razón por la cual no hay un aumento de partículas retrógradas, inclusive la asociación de APP (a través de KLC1) con  $kif5a$  o  $kif5c$  le permite mantener las mismas velocidades.

Es importante destacar la escasa selectividad que ha sido demostrada para las cadenas pesadas de kinesina-1. Por ejemplo, el motor molecular  $kif5a$  ha sido vinculado selectivamente con el transporte de los receptores GABA<sub>A</sub> y su delección condicional genera la aparición de ataques epilépticos (Nakajima et al, 2012).



Interesantemente este fenotipo no se fue observado en los ratones  $kif5c^{-/-}$  (Kanai et al, 2000), ni tampoco lo hemos observado en nuestros ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , sugiriendo que el transporte del receptor GABAa es específico del motor kif5a. Sin embargo, nuestros experimentos han demostrado que los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presentan fallas en la actividad de la vía indirecta (la cual es mediada por los receptores D2), a la vez que se observaron fallas en la presentación en membranas del receptor D2. Esta conclusión se basa en las alteraciones funcionales locomotoras en el animal  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , en las alteraciones locomotoras luego de la estimulación con agonistas y antagonistas de los receptores D2 y de la observación de una menor proporción del receptor D2 en membrana de sinaptosomas. Estos defectos podrían deberse a alteraciones en las dinámicas de transporte dependiente de microtúbulos o alternativamente a fallas en los mecanismos de endocitosis o reciclado del receptor donde Kif5b podría tener un rol (Schmidt et al, 2009). Para dilucidar específicamente este defecto será necesario realizar análisis de las dinámicas en tiempo real de transporte del receptor D2 fluorescente para poder confirmar la relevancia del motor molecular kif5b en su movimiento intracelular. Experimentos de imagen en tiempo real realizados en cultivos de estriado transfectados con un vector que exprese el receptor D2 fusionado a una proteína fluorescente, pueden ser un excelente medio para determinar las dinámicas de transporte del receptor (Falzone et al, 2009; Falzone et al, 2012; Otero et al, 2014). Una visión global permite interpretar los resultados diferencialmente por lo cual podría haber redundancia en alguna de las cargas de los motores moleculares más específicamente en el caso de las mitocondrias y APP, aunque otras cargas podrían depender específicamente de una subunidad motora

como Kif5b al observarse defectos selectivos del receptor dopaminérgico D2. Esto podría ser similar a lo observado en el caso del receptor GABA<sub>A</sub> con el motor Kif5a (Nakajima et al, 2012).

### **6.3 Defectos en la vía nigroestriatal generados por alteraciones del transporte.**

La realización de movimientos complejos y coordinados depende del control que establece la vía nigroestriatal a través de la liberación de dopamina y su interacción con los receptores dopaminérgicos del estriado (Calabresi et al, 2014). A pesar de que la deleción de kif5b en neuronas no inició eventos de neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas, en el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ , fallas en el metabolismo de dopamina fueron detectados mediante el estudio de síntesis y degradación. Sin embargo, desconocemos que elementos del metabolismo de la dopamina están perjudicados por la deleción de kif5b, si se trata de una menor síntesis o de una menor recaptación. Un responsable de controlar la síntesis y degradación de la dopamina es el transportador vesicular de monoaminas (VMAT2), encargado de internalizar la dopamina en vesículas (Lohr et al, 2015). Si bien la deleción de VMAT2 es letal (Fon et al, 1997), la caída del 95% de la expresión de VMAT2 no lo es (Colebrooke et al, 2006; Mooslehner et al, 2001). Nuestros experimentos demostraron que el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presenta una disminución de la degradación de dopamina al metabolito DOPAC sin la inducción de muerte neuronal. Sin embargo, la deleción de transportador VMAT2 lleva a un aumento en la degradación de dopamina a DOPAC y HVA también sin iniciar neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas. Es importante remarcar que la expresión de solo un 5%

de VMAT2 induce defectos en la coordinación motora durante el ensayo de rotarod y que los mismos pudieron ser superados mediante la inyección de L-DOPA. De forma similar, hemos observado en el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  un fenotipo hipolocomotor, en el campo abierto y en el rotarod, el cual puede ser superado a través de la inyección de anfetamina o el entrenamiento, sugiriendo que las fallas en la coordinación motora pueden ser superadas, aunque sería interesante aumentar el nivel de exigencia para determinar si los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  alcanzan los niveles de los ratones control. Es posible que los defectos en el metabolismo de dopamina observados en el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  no se deban a fallas en el transporte de VMAT2 debido a que los resultados observados son distintos. Se debería estudiar las dinámicas del transporte axonal de VMAT2 para saber si están afectadas y en qué medida. Es posible que defectos menores en sus dinámicas no perjudiquen de forma tan severa al metabolismo de dopamina como lo hace la caída de un 95% de su expresión.

## **6.4 El rol del transporte en la enfermedad de Parkinson.**

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que está caracterizada por la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas y agregados intracelulares conocidos como cuerpos de Lewy (Shulman et al, 2011). Trabajos realizados con 6-OHDA y con MPP, toxinas que afectan selectivamente a las neuronas dopaminérgicas, produjeron defectos en el transporte axonal durante las etapas iniciales (Lu et al, 2014; Morfini et al, 2007). Además, estudios realizados con cortes de cerebros de pacientes con Parkinson demostraron una disminución en los

niveles de expresión de motores moleculares (Chu et al, 2012). En este trabajo el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presentó un fenotipo hipolocomotor y fallas en la coordinación. Sin embargo estos problemas fueron evidentes en ausencia de muerte neuronal, los cuales pudieron ser superados por un aumento en la liberación de dopamina a través de la estimulación farmacológica. Nuestros resultados permiten suponer que el transporte intracelular impedido por la deleción de  $kif5b$  genera problemas en la vía nigroestriatal tanto en el metabolismo de la dopamina como en la distribución de los receptores D2. Aunque es necesario que se den las fallas en el transporte en la pre y en la post-sinapsis para que se vea reflejado en la locomoción de los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ . Los receptores dopaminérgicos D2 se expresan tanto en la pre como en la postsinapsis (Usiello et al, 2000) y la deleción de su expresión en neuronas dopaminérgicas o estriatales lleva fenotipos motores diferentes. Mientras que la deleción de los receptores presinápticos lleva a un aumento en la locomoción (Anzalone et al, 2012; Bello et al, 2011), la deleción de los receptores postsinápticos no tuvo mayores efectos sobre la locomoción, sin embargo los ratones fueron más sensibles a la estimulación del receptor D2 con quinpirole (Usiello et al, 2000). Llamativamente en este trabajo, los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  tuvieron una menor sensibilidad al quinpirole cuando se estimuló la liberación de dopamina, sugiriendo que los mecanismos de compensación sugeridos por Usiello no se hacen presentes en el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ .

## **6.5 El transporte axonal es fundamental para la coordinación de las vías directa e indirecta.**

Los movimientos se inician a partir de la activación coordinada de las vías directa e indirecta (Cui et al, 2013). Mientras que la vía directa estimula el movimiento, la vía indirecta inhibe movimientos que compiten con la toma de decisiones. A su vez la vía directa está compuesta por las MSN que expresan el receptor dopaminérgico D1 y la vía indirecta por las MSN que expresan el receptor dopaminérgico D2 (Gerfen et al, 2011). En este trabajo observamos que el ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presentaba un aumento en los inicios de movimiento, sugiriendo fallas en la capacidad para comenzar a moverse. Este fenotipo puede explicarse por una disminución en la presentación en membrana del receptor D2 que fueron observadas en los fraccionamientos. Una menor activación de la vía indirecta puede llevar a fallas en los inicios de movimiento. Además estos resultados podrían responder porque el ratón  $5b^{fl/fl} dat^{cre/+}$  no presentó defectos motores. Sin embargo, debería determinarse si la presentación en membrana de los receptores D2 de la pre-sinapsis se ve afectada o no por la delección de kif5b, en los ratones  $5b^{fl/fl} dat^{cre/+}$ . La delección de los receptores D2 pre-sinápticos aumentan la locomoción de los ratones knockout (Bello et al, 2011), pero es posible que fallas menores en la presentación de los receptores D2 pre-sinápticos no alcancen a generar un fenotipo hiperlocomotor. Aunque en el caso de la post-sinapsis una menor presentación de los receptores D2 generaría fallas en la coordinación de las vías directa e indirecta.

# **7. Conclusiones**

El ratón  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  presenta defectos en el transporte axonal de APP y de mitocondrias, sin la aparición de axonopatías ni muerte neuronal. A su vez los niveles de expresión de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 no cambian, pero la presentación de los receptores D2 en membrana disminuye debido a fallas en su transporte o en su reciclado. Esto generó un fenotipo hipolocomotor evidente en el ensayo de campo abierto y descoordinación en el rotarod. Interesantemente, algunos de los defectos de locomoción, como son los defectos de coordinación motora pueden ser superados mediante el entrenamiento. La estimulación de la liberación de dopamina recupera la locomoción en el campo abierto. La estimulación de la liberación de dopamina mediante anfetamina, junto con la aplicación de agonistas o antagonistas del receptor D2, determina fallas en la función de este receptor, dadas por defectos en su localización en membrana, como se vio en el fraccionamiento subcelular. Los experimentos realizados en este trabajo nos permiten concluir que:

- Las mitocondrias y la vesícula de APP son cargas transportadas por más de un motor molecular KHC. Estos datos sugieren que existe redundancia en el transporte de estas cargas con las demás cadenas pesadas que componen el motor kinesina-1 (Kif5a y Kif5c).
- La delección de Kif5b en el sistema nervioso central induce fenotipos de hipolocomoción y defectos en la coordinación motora.
- El fenotipo más importante fue la hipolocomoción, mientras que los circuitos periféricos no se vieron afectados. Esto sugiere que distintos tipos neuronales tienen distinta sensibilidad a la expresión de Kif5b.

- El metabolismo de la dopamina se altera por la delección de kif5b específicamente por una disminución en las tasas de degradación de dopamina intracelular que posibilitan niveles similares de dopamina total.
- La delección específica de Kif5b en neuronas dopaminérgicas no generó defectos motores indicando que los defectos presinápticos no son suficientes para explicar los fenotipos de los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$ .
- La actividad del receptor D2 se ve afectada por una anómala presentación en membrana que pueden estar generadas por fallas en su transporte o en los mecanismos de reciclado debido a la delección del motor Kif5b.
- Los ratones desarrollados y caracterizados en este trabajo permiten estudiar selectivamente la función de los receptores D2 en la locomoción.

**Este trabajo nos permite concluir que el motor molecular kif5b es fundamental para la coordinación motora y el correcto funcionamiento de la vía nigroestriatal.**



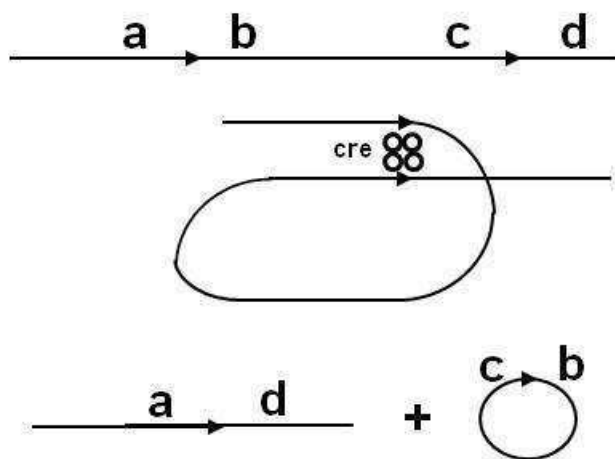
# **8. Materiales y Métodos**

## 8.1 Animales y apareamiento.

Para la realización de este trabajo se emplearon ratones de la cepa C57/bl6. Los animales fueron mantenidos en ciclos de luz/oscuridad de doce horas y alimentación ad libitum. Para generar los ratones delecionados de forma condicional del motor molecular kif5b (knockout condicional), se cruzaron las siguientes líneas: ratones transgénicos que tienen dos sitios loxp flanqueando el exón 2 del gen kif5b ( $5b^{fl/fl}$ ), (Cui et al, 2011) se cruzaron con ratones que expresan el gen de la recombinasa cre bajo el control del promotor de nestina ( $nes^{cre/+}$ ), (Tronche et al, 1999) o con los ratones que expresan cre bajo el control de un sitio ires, en el gen de dat ( $dat^{cre/+}$ ), (Bäckman et al., 2006). Una vez obtenidos los heterocigotas ( $5b^{fl/+} nes^{cre/+}$  o  $5b^{fl/+} dat^{cre/+}$ ) estos se emparejaron con los ratones  $5b^{fl/fl}$ . En este cruzamiento se obtuvieron los ratones homocigotas ( $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  o  $5b^{fl/fl} dat^{cre/+}$ ), los heterocigotas y los ratones control ( $5b^{fl/fl} nes^{+/+}$ ;  $5b^{fl/fl} dat^{+/+}$ ) usados en los experimentos. Debido a que ambos sexos de los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  fueron viables y fértiles, se realizaron cruzamientos entre los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  y  $5b^{fl/fl}$  obteniendo así los ratones usados como controles y los ratones experimentales. El ratón Ai14 (Madisen et al, 2010) fue apareado con los ratones  $nes^{cre/+}$  y  $dat^{cre/+}$  para evidenciar la expresión de cre. Los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  utilizados en los experimentos fueron adultos de 2 meses de edad. En el caso de los ratones  $5b^{fl/fl} dat^{cre/+}$  se utilizaron ratones de 2, 6 y 12 meses según fue indicado en los experimentos. Los experimentos con animales fueron aprobados por el comité de ética y cuidado animal institucional de la Facultad de Medicina (CICUAL-UBA)

## 8.2 Recombinación homóloga por cre recombinasa.

La recombinasa cre reconoce dos sitios denominados loxp. Cuando estas secuencias se encuentran en la misma orientación, cre realiza una recombinación homóloga, escindiendo en forma de lazo el dna que se encuentra en el medio de estos dos sitios. De esta forma se puede bajar la expresión de proteínas en células específicas, dependiendo de las células en las que se exprese cre (Branda et al., 2004).



**Figura 24. Mecanismo de escisión por recombinación homóloga.** La recombinasa cre (4 óvalos) reconoce los sitios Loxp (flechas) dejando el dna con los fragmentos a y d separados por uno de los sitios, y un lazo con los sitios c y b separados por un sitio loxp.

## 8.3 Genotipificación.

Para determinar el genotipo de los animales se realizó una extracción de dna a partir de muestras de orejas de ratón. Para ello, una vez obtenidas las muestras se colocaron a 95°C en una solución de NaOH 50mM durante una hora. Luego se dejaron enfriar por 15 minutos y se neutralizó con una solución tris-HCl pH: 8.8. Las muestras fueron

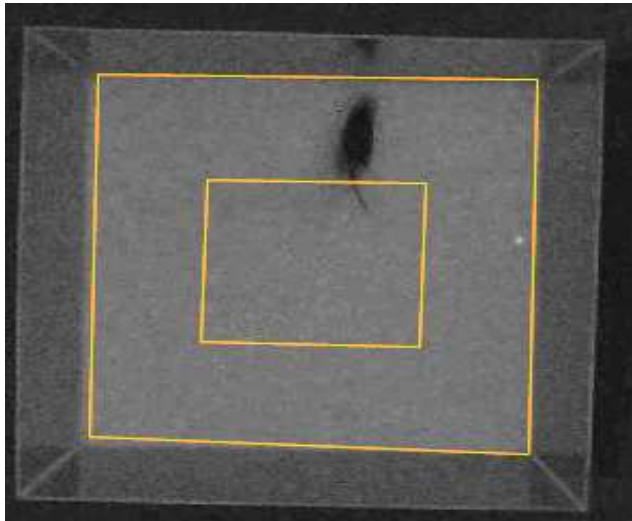
centrifugadas durante 10 minutos a 1000rpm. Para la pcr de kif5b se usaron los siguientes primers: P<sub>1</sub>: TGAAGGCTAAGTCAGATATGGATGC, P<sub>2</sub>: GGATTGGCACCTTTACCTAGAAGG y P<sub>3</sub>: TTACTIONACTGAACCTGGCTTCCTAG. Para la pcr de dat<sup>cre/+</sup> se usaron los siguientes primers: dat cre<sub>1</sub>: TGGCTGTTGGTGTAAGTGG, ires; CCAAAGACGGCAATATGGT y dat cre<sub>2</sub>: GGACAGGGACATGGTTGACT. Para la pcr de nestin<sup>cre/+</sup> se utilizaron los primers cre<sub>1</sub>:GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG y cre<sub>2</sub>: AAAATTTGCCTGCATTACCG.

## **8.4 Experimentos conductuales**

### **8.4.1 Campo abierto**

Para la realización del ensayo de campo abierto, los animales fueron colocados de forma separada en una caja de 50cm x 50cm x 50cm. Durante 30 minutos se permitió que los animales exploraran el lugar, mientras fueron filmados por una cámara. Una vez obtenidas las películas, se utilizó el programa Any-maze Video Tracking System para analizarlas. Se determinó la distancia recorrida por los animales, el número de veces que iniciaron movimientos y la distancia recorrida a lo largo de bloques de 5 minutos. Este tipo de ensayo nos permitió evaluar el comportamiento no condicionado y exploración espontánea, así como también estados de ánimo más complejos como la ansiedad(Lipkind et al, 2004). Para realizar una estimación de los niveles de ansiedad de los ratones, se estudió el tiempo que pasaron moviéndose en el centro del campo abierto en relación al tiempo en movimiento total. Los ratones prefieren moverse cerca de las paredes del campo abierto (periferia) debido a que se sienten más protegidos.

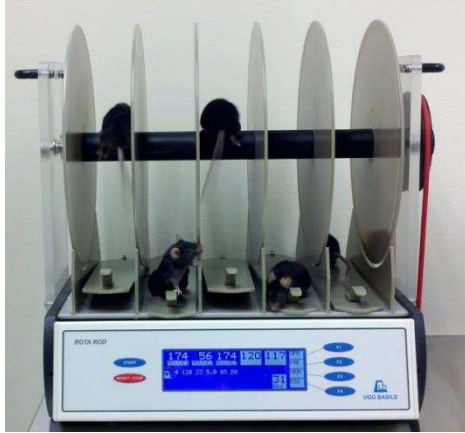
Por el contrario ven al centro del campo abierto como un lugar inseguro y tienden a pasar menos tiempo en él. El tiempo que pasa un ratón en el centro nos permite evaluar su nivel de ansiedad, a mayor ansiedad menos tiempo en el centro.



**Figura 25. Experimento de campo abierto.** Los animales fueron filmados durante 30 minutos en un campo abierto. Las películas fueron analizadas usando el programa any maze, obteniendo información sobre la distancia que se movieron, los inicios de movimiento y el tiempo que pasaron en el centro del equipo.

### 8.4.2 Rotarod

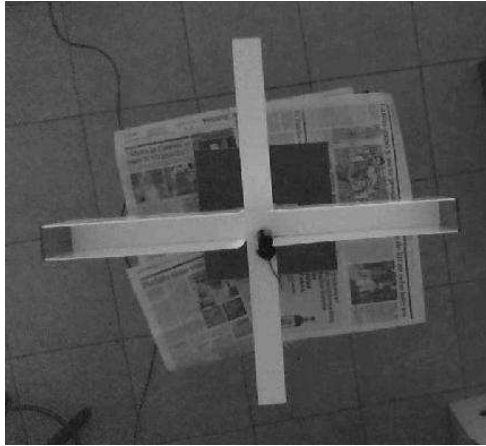
Los animales fueron colocados en un rotarod de velocidad constante a 14rpm. Se realizaron 4 entrenamientos de 10 minutos cada uno. Los primeros dos entrenamientos se hicieron en el mismo día, con un descanso de 2 horas entre cada sesión. Los últimos dos entrenamientos se llevaron a cabo el día siguiente, también con un descanso de dos horas. Se contó el número de veces que los animales se cayeron y el tiempo máximo que pasaron arriba del equipo.



**Figura 26. Equipo rotarod.** Equipo rotarod como el que fue utilizado para llevar los experimentos a cabo. Se cuantificó el número de caídas y el tiempo máximo que duraron los ratones encima del equipo.

### **8.4.3 Laberinto en cruz elevado.**

Se utilizó un laberinto en cruz elevado con dos brazos abiertos (sin paredes) y dos brazos cerrados (Lister, 1987). Cada brazo era de 5cm x 30cm y midiendo el centro 5cm x 5cm. Los ratones permanecieron 5 minutos en el equipo tiempo durante el que se los filmó. Con la ayuda del programa Any-Maze contabilizamos el tiempo que pasaron los animales dentro de los brazos abiertos en relación a los brazos cerrados y el número de entradas que realizaron a los brazos abiertos. Los animales se sienten más inseguros en los brazos abiertos, por eso prefieren estar en los brazos cerrados. Aquellos ratones que tienen mayor ansiedad tienden a permanecer aún más tiempo en los brazos cerrados.



**Figura 27. Laberinto en cruz elevado.** En la línea horizontal se encuentran los brazos cerrados y en el eje vertical los brazos abiertos.

#### **8.4.4 Análisis del patrón de marcha**

Las patas de los ratones fueron pintadas con tinta china, y se movieron a lo largo de un camino de papel secante. Se cuantificó la distancia recorrida por cada una de las patas. En el caso de que a distancia recorrida por las patas difiera, el ratón presentaría defectos en la coordinación durante la marcha.

#### **8.4.5 Sensibilidad al dolor.**

Se colocaron los animales en una plataforma caliente a 55 °C y se midió el tiempo que tardaron en saltar de la plancha, con un máximo de 12 segundos para no lastimarlos. La latencia a saltar determina la respuesta del arco reflejo.

## **8.5 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Se extrajeron estriados de los ratones y se mantuvieron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Al momento de procesarse la muestra, fueron homogenizados individualmente con una solución  $\text{HClO}_4$  0.2N y centrifugados a 13000g durante 7min. El sobrenadante fue inyectado en una columna NOVA-PAK C18 3.9x150mm, siendo la fase móvil de PicB8 4.8ml,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$  10.8g, EDTA (0.99mM) y metanol 72ml. Para la cromatografía se utilizó el equipo: Peak Simple Chromatography data system. Con el detector Amperometric Detector LC 48, para medir el voltaje. El programa Peack Easy se utilizó para analizar los picos de intensidad de voltaje. Se normalizaron las áreas de los picos con respecto a una muestra control, para calcular la concentración de Dopamina y de los metabolitos DOPAC y HVA. La cromatografía fue realizada en el Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA) en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA.

## **8.6 Drogas.**

Anfetamina (7.5mg/kg), (-)quinpirole hydrochloride (0.05mg/kg Santa Cruz Biotechnology), SCH 23390 (0.25mg/kg Santa Cruz Biotechnology) y risperidona (0.025mg/kg). La inyección de anfetamina fue dada en una única dosis intraperitonealmente, 15 minutos antes de realizar el ensayo de campo abierto. Para los ensayos de SCH 23390 y anfetamina, quinpirole y anfetamina y risperidona y anfetamina, se realizaron primero las inyecciones de SCH 23390, quinpirole o



risperidona y 15 minutos después se realizaron las inyecciones de amfetamina. Las soluciones fueron realizadas en PBS.

## **8.7 Cortes histológicos**

Los ratones fueron sacrificados con CO<sub>2</sub> e inmediatamente fueron perfundidos con una solución de pbs 1M y posteriormente fijados con una solución de paraformaldehído 4% en pbs 1M. Una vez perfundidos y fijados los animales, se extrajo el cerebro el cual fue colocado en la solución de paraformaldehído por 18 horas a 4 grados. Al día siguiente se cambió la solución por sacarosa 20% en H<sub>2</sub>O. Los cerebros fijados fueron cortados en secciones de 50µm de ancho en un criostato. Los cortes de un cerebro se guardaron de forma secuencial en 6 pocillos de una placa 24 pocillos. Este tipo de secuenciación permitió que en todos los pocillos se encuentre representado todo el cerebro del ratón

### **8.7.1 Basofilia**

Se trataron portaobjetos con gelatina con el siguiente protocolo: 10 minutos de agua y detergente, 10 minutos de lavados con agua común, 10 minutos de lavados con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, 10 minutos de lavados con EtOH 70%/HCl 1%, 10 minutos de lavados con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, una hora de gelatina 0.5% cromo-alumbre 0.05% en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se dejó secar en la estufa hasta el día siguiente. Los cortes de cerebro de ratón fueron montados

secuencialmente en estos portaobjetos de forma tal de tener representado todo el cerebro del animal. Los cortes fueron deshidratados y rehidratados pasando por soluciones de alcohol de la siguiente forma: 2 minutos en etanol 70%, 2 minutos en etanol 96%, 2 minutos en etanol 100%, 5 minutos en xilol. Después de deshidratarse las muestras se procedió a la rehidratación haciendo los pasos invertidos. Los tejidos rehidratados fueron colocados en una solución de azul de toluidina y luego lavados con etanol 96% y etanol 70% hasta que tuvieran un color intenso pero se pudieran evaluar las distintas estructuras del cerebro.

### **8.7.2 Análisis volumétrico del cerebro**

Se sacaron fotos de los cortes teñidos, con luz blanca. Utilizando el programa ImageJ se trazó el contorno de la corteza, de los ventrículos y del cerebro, para obtener el valor del área. Para la cuantificación del volumen se multiplicó el área obtenida, por 50 $\mu$ m (siendo el grosor de cada corte) y luego se multiplico por el número de cortes que se cuantificó. De esta forma quedó expresada la siguiente fórmula:: Volumen (mm<sup>3</sup>): (área mm<sup>2</sup>) x 0.05mm x 7(número de cortes).

### **8.7.3 Inmunohistoquímica.**

Los cortes de cerebro fueron bloqueados con una solución de suero de cabra 1%, BSA 3% y triton x-100 0.1% en PBS, durante una hora. Luego se colocó el anticuerpo primario diluido en la misma solución, por 18 horas. Se realizaron tres lavados de 10

minutos cada uno con PBS 1M. Luego de los lavados se colocó el anticuerpo secundario biotinilado, por dos horas a temperatura ambiente. Después se realizaron otros tres lavados de 10 minutos cada uno. Para revelar la inmunohistoquímica, se realizó una incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3% en PBS 1M) para inhibir la peroxidasa endógena, seguida por tres lavados de diez minutos cada uno. Una vez terminados los lavados, se realizó una incubación con streptavidina peroxidasa (Vector Laboratories) por media hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados más, y después se siguió el protocolo de DAB Peroxidase Substrate (Vector Laboratories), el cual consistió en una incubación con una solución de DAB y una solución de níquel durante 10 minutos. Para la cuantificación de las neuronas TH positivas, se realizó un conteo manual, en las zonas de la sustancia nigra y de la VTA. El número de células obtenido se dividió por el área ocupada por las estructuras, la cual fue obtenida mediante una delineación del área medida gracias a la calibración del tamaño del pixel, con el programa ImageJ.

#### **8.7.4 Inmunofluorescencia.**

Los cortes de cerebro fueron bloqueados con una solución de suero de cabra 1%, BSA 3% y triton x-100 0.1% en PBS. Una vez bloqueados los cortes, se incubaron por 18 horas con anticuerpo primario diluido en la misma solución. Después de la incubación se realizaron tres lavados de 10 minutos y se incubó por dos horas con anticuerpo secundario fluorescente. Cuando se terminó la incubación, se realizaron tres lavados más, y finalmente los cortes fueron montados.

#### **Anticuerpos**

Anticuerpos primarios: Tirosina Hidroxilasa ratón y conejo (1/600 chemicon), kif5b conejo (1/200).

Anticuerpos secundarios: cabra anti ratón alexa fluor 568 (1/200), cabra anti conejo alexa fluor 488 (1/200).

## **8.8 Western Blot.**

Las muestras fueron tratadas con un buffer de lisis (1%NP40, 50mM Tris-HCl pH:8.8 150mM NaCl)y se cuantificaron utilizando el kit BCA (Pierce). Las proteínas fueron diluídas en un buffer de siembra (150mM Tris HCl pH:8.8, 40% glicerol, 0.8g SDS, punta de espátula de azul de bromo fenol, 2%  $\beta$ -Mercaptoetanol) que permitió su desnaturalización a 94°C durante diez minutos. Una vez desnaturalizadas las proteínas, estas fueron sembradas en un gel de poliacrilamida 10% con un ancho de 1mm. Las proteínas luego de separarse por tamaño fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 300mA.

### **Anticuerpos**

Anticuerpos primarios: Tirosina Hidroxilasa ratón y conejo (1/600 chemicon), kif5b conejo (1/200), KHC ratón (1/1000), Tubulina (1/10000), Drd2conejo (1/500), NMDAr conejo (1/1000).

Anticuerpos secundarios: cabra anti ratón hrp (1/5000), cabra anti conejo hrp (1/5000),

## **8.9 Cultivo celular.**

### **8.9.1 Cultivo primario de hipocampo de ratón.**

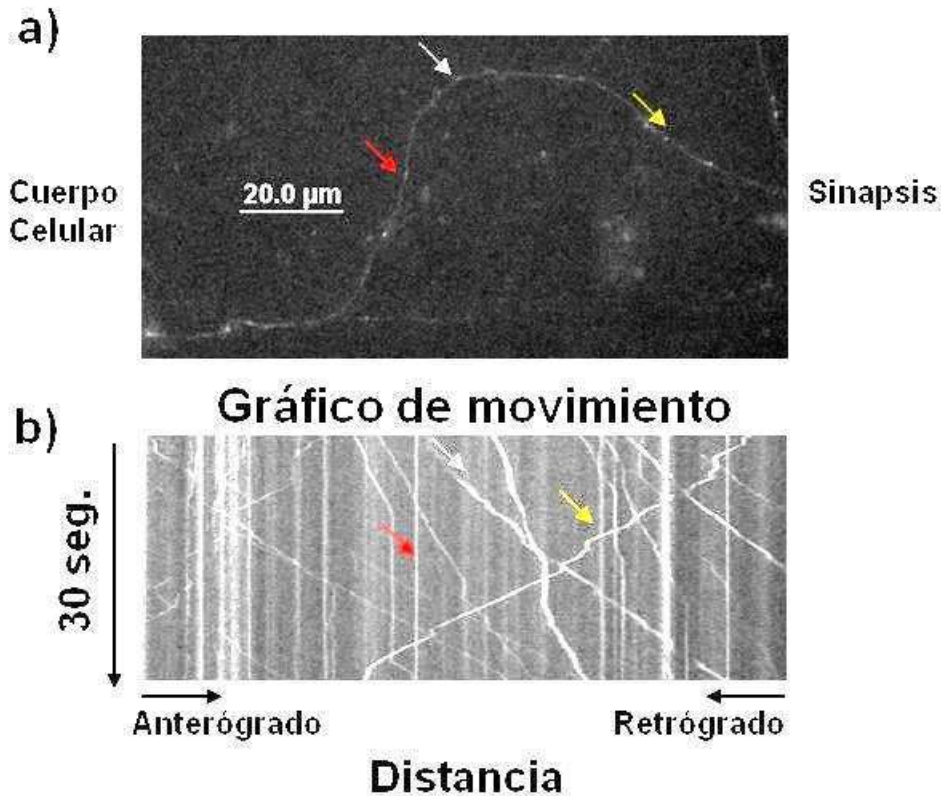
Se extrajeron muestras de cola de ratón de día postnatal 0, para genotipificar mediante el protocolo que se utiliza con las muestras de orejas. Una vez determinado los genotipos de los ratones, se realizaron los cultivos hipocampales. Los hipocampos de los ratones fueron disecados y procesados de forma separada para poder identificar las células pertenecientes a cada ratón. Los ratones fueron anestesiados en pbs frío para luego extraer sus cabezas. Se abrió el cartílago y se retiró el cerebro. Una vez disecados los hipocampos, fueron lavados con DMEM y luego incubados 15 minutos con mixture A (PBS 4ml, DL-Cisteína 1mg, BSA 1mg y D-glucosa 25mg), 45u de papaína y 0.05% de DNAsal a 37 °C en agitación. La mixture A fue extraída y se inactivaron los restos con DMEM con 10% de suero fetal bovino y 500µM de glutamina. Después de inactivar la mixture A, se extrajo el DMEM y se colocó DMEM nuevo fresco. Se realizó una disección mecánica y luego se plaquearon las células en vidrios pretratados con poly-L-lisina y se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Dos horas después del plaqueo, se cambió el medio por Neurobasal suplementado con B27.

### **8.9.2 Transfecciones y plásmidos usados.**

Se utilizaron los siguientes plásmidos: pcDNA3-app-yfp (app-yfp) y pcDNA3-mito-gfp (mito-gfp), para ver mitocondrias (Falzone et al, 2009; Otero et al, 2014). La transfección se realizó con lipoafectamina 2000 de invitrogen en cultivos de 7 a 10 días.

### **8.9.3 Películas.**

Se utilizó un microscopio Olympus IX81, acoplado a una cámara con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 grados, para mantener las condiciones ambientales en las que se encuentran en la incubadora. El microscopio se encuentra acoplado a una cámara DP170. Las películas se realizaron a 60x con una amplificación manual de 1.6x, llegando a 96x total. Las películas se hicieron en los axones neuronales. Para determinar el axón, la filmación se llevó a cabo en las proyecciones que tuvieran más de tres campos de distancia del soma celular. En el caso de las películas de app-yfp, la duración fue de 30 segundos con una tasa de 5 frames/segundo. Las películas de mito-gfp tuvieron una resolución temporal de 1frame/2 segundos y una duración de 5 minutos. Para poder analizar las películas se transformaron las películas a gráficos de movimiento utilizando el programa ImageJ (Falzone & Stokin, 2012). A partir de estos gráficos de movimiento se pueden analizar la proporción de partículas que viajan en transporte anterógrado o retrógrado y las que permanecen estacionarias. También obtuvimos información acerca de la velocidad de movimiento de las partículas y de la densidad.



**Figura 28. Análisis de películas.** Diagrama de una neurona cuerpo celular a la izquierda y las sinapsis a la derecha (a). Película del axón de una neurona trasfectada con app-yfp. Se observan las vesículas que se transportan (b). Gráfico de movimiento obtenido de la película con el programa ImageJ. En el eje Y se mide el tiempo y en el eje X la distancia. La orientación del gráfico se corresponde con la de la película. La flecha blanca marca una partícula que se encuentra estacionaria, la flecha roja marca una partícula que se mueve de izquierda a derecha (transporte anterógrado) y la flecha amarilla marca una partícula que se mueve de derecha a izquierda (transporte retrógrado).

## 8.10 PCR en tiempo real.

El estriado fue disecado de los ratones  $5b^{fl/fl} nes^{+/+}$  y  $5b^{fl/fl} nes^{cre/+}$  y se lisó con trisol. El mrna fue extraído y transcrito a cDNA utilizando el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Los primers utilizados para la amplificación fueron los siguientes:  
 DRD2, forward primer: 5' CCACACTGGTTATGCCCTGG 3'; reverse: 5'  
 GGTTC AAGATGCTTGCTGTGC 3'; DRD1, forward:

5' GATGGCTCCTAACACTTCTACC 3'; reverse: 5' GGCTGTGAGGATGCGAAAG 3'

Ciclofilina fue utilizado como control para medir los niveles de expresión basales con los primers forward: 5' TGGAGATGAATCTGTAGGACGA 3'; reverse: 5' GAAGTCTCCACCCTGGATCA 3'.

## **8.11 Fraccionamiento subcelular.**

Las fracciones sinaptosomales fueron preparadas a partir de estriados disecados de los ratones de acuerdo al siguiente protocolo. Seis estriados fueron homogenizados en un homogenizador de vidrio en 10 volúmenes de buffer B (0.32M sacarosa, 4mM Hepes e inhibidores de proteasas, con un pH 7,3). El homogenato se centrifugó a 800g durante 10 minutos a 4°C. El pellet fue descartado y el sobrenadante (S1) fue centrifugado nuevamente por 15 minutos a 9200g. El sobrenadante (S2) con la fracción soluble fue guardado y el precipitado (P2) se resuspendió en 10 volúmenes de buffer B. P2 fue luego centrifugado durante 15 minutos a 10500rpm para generar la fracción P'2 que contiene la membrana plasmática cruda. Esta fracción fue sometida a un shock hipotónico cuando se resuspendió en 9 volúmenes de agua y 1 volumen de buffer B. La isotonicidad se recuperó con una solución de Hepes/NaOH pH7.2, 1M para llevar a la solución a una concentración 4mM. Después de una incubación de media hora en hielo, se realizó una centrifugación de 20 minutos a 25000g para guardar la fracción Lp1. Por western blot se analizaron las fracciones que se utilizaron fueron: homogenato, S2 (que contiene la fracción soluble), P'2 (fracción con membrana plasmática cruda) y Lp1 (membrana plasmática de la sinapsis).



## 8.12 Estadística

Los datos se presentan como media  $\pm$ SEM, y la significancia fue \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ . El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Graphpad Prism 5.0. Los test estadísticos usados fueron Test T o análisis ANOVA seguido de un post tets de Bonferroni según fue indicado en cada experimento.

# 9. Bibliografía

Abe, N.; Almenar-Queralt, A.; Lillo, C.; Shen, Z.; Lozach, J.; Briggs, S.; Williams D.; Goldstein L.; Cavalli, V. (2009). Sunday driver interacts with two distinct classes of axonal organelles. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34628–34639. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.035022>

Abeliovich, A.; Schmitz, Y.; Farinas, I.; Choi-Lundberg, D.; Ho, W.; Castillo, P.; Shinsky, N.; Verdugo, J.; Armanini, M.; Ryan, A.; Hynes, M.; Phillips, H.; Sulzer, D.; Rosenthal, a. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25(1), 239–252. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80886-7](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80886-7)

Aiso, M.; Potter, W.; Saavedra, J. (1987). Axonal transport of dopamine D1 receptors in the rat brain. *Brain Research*, 426, 392–396.

Akhmanova, A. & Steinmetz, M. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(12), 711–726. <http://doi.org/10.1038/nrm4084>

Al-Bassam, S.; Xu, M.; Wandless, T.; Arnold, D. (2012). Differential trafficking of transport vesicles contributes to the localization of dendritic proteins. *Cell Reports*, 2(1), 89–100. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.018>

Anzalone, A.; Lizardi-Ortiz, J.; Ramos, M.; De Mei, C.; Hopf, F. W.; Iaccarino, C.; Halbout, B.; Jacobsen, J.; Kinoshita, C.; Welter, M.; Caron, M.; Bonci, A.; Sulzer, D.; Borrelli, E. (2012). Dual control of dopamine synthesis and release by presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal*

*of the Society for Neuroscience*, 32(26), 9023–34.  
<http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0918-12.2012>

Baas, P.; Deitch, J.; Black, M.; Banker, G. (1988). Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: Uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(21):8335-8339 85(November), 8335–8339.

Bäckman, C.; Malik, N.; Zhang, Y.; Shan, L.; Grinberg, A.; Hoffer, B.; Westphal, H.; Tomac, A. (2006). Characterization of a Mouse Strain Expressing Cre Recombinase From the 3' Untranslated Region of the Dopamine Transporter Locus, *Genesis*390, 383–390. <http://doi.org/10.1002/dvg>

Bai, J.; Cheng, K.; Liu, M.; Li, C. (2016). Impact of the  $\alpha$ -Synuclein Initial Ensemble Structure on Fibrillation Pathways and Kinetics. *Journal of Physical Chemistry B*, 120(12), 3140–3147. <http://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b01225>

Baik, J.; Picetti, R.; Saiardi, A.; Thiriet, G.; Dierich, A.; Depaulis, A.; Le Meur, M.; Borrelli, E.(1995).Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors, *Nature*377, 424 - 428doi:10.1038/377424a0

Barry, J.; Xu, M.; Gu, Y.; Dangel, A.; Jukkola, P.; Shrestha, C.; Gu, C. (2013). Activation of conventional kinesin motors in clusters by Shaw voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 9), 2027–41. <http://doi.org/10.1242/jcs.122234>

Bay-Richter, C.; O'Callaghan, M.; Mathur, N.; O'Tuathaigh, C.; Heery, D.; Fone, K.; Waddington, J.; Moran, P. (2013). D-amphetamine and antipsychotic drug effects on latent inhibition in mice lacking dopamine D2 receptors. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(8), 1512–20. <http://doi.org/10.1038/npp.2013.50>

Beaulieu, J.; Gainetdinov, R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 182–217. <http://doi.org/10.1124/pr.110.002642>

Blasius, T.; Cai, D.; Jih, G.; Toret, C.; Verhey, K. (2007). Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. *Journal of Cell Biology*, 176(1), 11–17. <http://doi.org/10.1083/jcb.200605099>

Bolam, J.; Hanley, J.; Booth P.; Bevan, M.. (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy*.;196(Pt 4):527-542. doi:10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x.

Branda, C.; Dymecki, S. (2004). Talking about a Revolution: The Impact of Site-Specific Recombinases on Genetic Analyses in Mice, *Developmental Cell*, 6, 7–28. [http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00399-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00399-X)

Braun, A.; Chase, T. (1986). Obligatory D-1/D-2 receptor interaction in the generation of dopamine agonist related behaviors, *European Journal of pharmacology*131, 301–306. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999\(86\)90588-1](http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(86)90588-1)

Burack, M.; Silverman, M.; Banker, G. (2000). The role of selective transport in neuronal protein sorting. *Neuron*, 26(2), 465–472. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81178-2](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81178-2)

Burke, R.; Malley, K. (2013). Axon degeneration in Parkinson ' s disease. *Experimental Neurology*, 246, 72–83. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.011>

Burré, J.; Sharma, M.; Tsetsenis, T.; Buchman, V.; Etherton, M. R.; Südhof, T. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5999), 1663–7. <http://doi.org/10.1126/science.1195227>

Burton, P. (1988). Dendrites of mitral cell neurons contain microtubules of opposite polarity. *Brain Research*, 473(1), 107–115. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90321-6](http://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90321-6)

Cai, Q.; Gerwin, C.; Sheng, Z. (2005). Syntabuline-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes, *Journal of Cell Biology*, 170(6). <http://doi.org/10.1083/jcb.200506042>

Calabresi, P.; Picconi, B.; Tozzi, A.; Ghiglieri, V.; Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature Neuroscience*, 17(8), 1022–1030. <http://doi.org/10.1038/nn.3743>

Cazorla, M.; Carvalho, F.; Chohan, M.; Shegda, M.; Chuhma, N.; Rayport, S.; Ahmari, S.; Moore, Holly.; Kellendonk, C. Dopamine D2 Receptors Regulate the Anatomical and Functional Balance of Basal Ganglia Circuitry, *Neuron*, 8; 81(1): 153–164. [doi:10.1016/j.neuron.2013.10.041](http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.041).

Cheng, H.; Ulane, C.; Burke, R.(2010). Clinical progression in Parkinson's disease and the neurobiology of Axons. *Annals of Neurology*, 67(6), 715–725. <http://doi.org/10.1002/ana.21995>.Clinical

Cheng, Y.; Chang, J.; Chen, C.; Chen, H. (2015). Autophagy modulates endoplasmic reticulum stress-induced cell death in podocytes: a protective role. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 240(4), 467–76. <http://doi.org/10.1177/1535370214553772>

Chu, Y.; Morfini, G.; Langhamer, L.; He, Y.; Brady, S.; Kordower, J. (2012). Alterations in axonal transport motor proteins in sporadic and experimental Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 135(Pt 7), 2058–73. <http://doi.org/10.1093/brain/aws133>

Cisek, P.;Kalaska, J. F. (2010). Neural mechanisms for interacting with a world full of action choices. *Annual Review of Neuroscience*, 33(March), 269–298. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135409>

Colebrooke, R.; Humby, T.; Lynch, P.; McGowan, D.; Xia, J.; Emson, P. (2006). Age-related decline in striatal dopamine content and motor performance occurs in the absence of nigral cell loss in a genetic mouse model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 24(9), 2622–2630. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05143.x>

Collins, L.; Galtieri, D.; Collins, P.; Jones, S.; Port, R.; Paul, N.; Hockemeyer, J.; Müller, C; Salamone, J. (2010). Interactions between adenosine and dopamine receptor

antagonists with different selectivity profiles: Effects on locomotor activity. *Behavioural Brain Research*, 211(2), 148–55. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.003>

Coy, D.; Hancock, W.; Wagenbach, M.; Howard, J. (1999). Kinesin ' s tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain, *Nature Cell Biology*1(September)288 - 292.[doi:10.1038/13001](http://doi.org/10.1038/13001)

Cui, G.; Jun, S.; Jin, X.; Pham, M.; Vogel, S.; Lovinger, D.; Costa, R. (2013). Current activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*. 2013;494(7436):238-242. [doi:10.1038/nature11846](http://doi.org/10.1038/nature11846).

Cui, J.; Wang, Z.; Cheng, Q.; Lin, R.; Zhang, X.; Leung, P.; Copeland, N.; Jenkins, N.; Yao, K.; Huang, J. (2011). Targeted Inactivation of Kinesin-1 in Pancreatic  $\beta$ -Cells In Vivo Leads to Insulin Secretory Deficiency, *Diabetes*60(January). <http://doi.org/10.2337/db09-1078>.

Dagda, R.; Cherra III, S.; Kulich, S.; Tandon, A.; Park, D.; Chu, C. (2009) Loss of PINK1 Function Promotes Mitophagy through Effects on Oxidative Stress and Mitochondrial Fission. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13843–13855. <http://doi.org/10.1074/jbc.M808515200>.

Daubner, S.; Le, T.; Wang, S. (2012). Tyrosine Hydroxylase and Regulation of Dopamine Synthesis. *Arch Biochem Biophys*, 508(1), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017>.Tyrosine



De Vos, K.; Grierson, A.; Ackerley, S.; Miller, C. (2008). Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 151–73. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090711>

Dehmelt, L.; Halpain, S. (2004). Protein family review The MAP2 / Tau family of microtubule-associated proteins, *Genome Biology*. 2005;6(1):204. doi:10.1186/gb-2004-6-1-204.

Deinhardt, K., Salinas, S., Verastegui, C., Watson, R., Worth, D., Hanrahan, S., ... Schiavo, G. (2006). Rab5 and Rab7 Control Endocytic Sorting along the Axonal Retrograde Transport Pathway. *Neuron*, 52(2), 293–305. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.018>

Desai, R.; Terry, P.; Katz, J. (2005). A comparison of the locomotor stimulant effects of D1-like receptor agonists in mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 81(4), 843–8. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.06.006>

Dickson, D.; Braak, H.; Duda, J.; Duyckaerts, C.; Gasser, T.; Halliday, G.; J.; Leverenz, J.; Del Tredici, K.; Wszolek, Z.; Litvan, I. (2009). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *The Lancet Neurology*, 8(12), 1150–1157. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70238-8](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70238-8)

Dietrich, K.; Sindelar, C.; Brewer, P.; Downing, K.; Cremona, C.; Rice, S.(2008). The kinesin-1 motor protein is regulated by a direct interaction of its head and tail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26), 8938–43. <http://doi.org/10.1073/pnas.0803575105>

Dixit R.; Ross J.; Goldman Y.; Holzbaur E. (2008) Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau. *Science* (New York, NY);319(5866):1086-1089. doi:10.1126/science.1152993.

Dobbs, L.; Kaplan, A.; Lemos, J.; Matsui, A.; Rubinstein, M.; Alvarez, V. (2016). Dopamine Regulation of Lateral Inhibition between Striatal Neurons Gates the Stimulant Actions of Cocaine. *Neuron*, 90(5), 1100–1113. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.031>

Drago, J.; Gerfen, C.; Lachowicz, J.; Steinert, H.; Hollon, T.; Love, P.; Ooi, G.; Grinberg, A.; Lee, E.; Huang, S. (1994). Altered striatal function in a mutant mouse lacking D1A dopamine receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(26):12564-12568.

Duka, T.; Duka, V.; Joyce, J.; Sidhu, A. (2009). Alpha-Synuclein contributes to GSK-3beta-catalyzed Tau phosphorylation in Parkinson's disease models. *The FASEB Journal*. 2009;23(9):2820-2830. doi:10.1096/fj.08-120410.

Emamzadeh, F. (2016). Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of Research in Medical Sciences*, 21(2). <http://doi.org/10.4103/1735-1995.181989>

Encalada, S.; Goldstein, L. (2014). Biophysical challenges to axonal transport: motor-cargo deficiencies and neurodegeneration. *Annual Review of Biophysics*, 43(March), 141–69. <http://doi.org/10.1146/annurev-biophys-051013-022746>

Fahn, S. (2003). Description of Parkinson' s Disease as a Clinical Syndrome. *Annals New York Academy of Sciences*, 991, 1–14. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07458.x>

Falzone, T.; Stokin, G. (2012). Imaging amyloid precursor protein in vivo: an axonal transport assay. *Neurotrophic Factors*, 846, 295–303. <http://doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7>

Falzone, T.; Gunawardena, S.; McCleary, D.; Reis, G.; Goldstein, L. (2010). Kinesin-1 transport reductions enhance human tau hyperphosphorylation, aggregation and neurodegeneration in animal models of tauopathies. *Human Molecular Genetics*, 19(22), 4399–408. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddq363>

Falzone, T.; Stokin, G. B.; Lillo, C.; Rodrigues, E. ; Westerman, E.; Williams, D.; Goldstein, L. (2009). Axonal stress kinase activation and tau misbehavior induced by kinesin-1 transport defects. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(18), 5758–67. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0780-09.2009>

Fan, X.; Xu, M.; Hess, E. (2010). D2 dopamine receptor sybtype-mediated hyperactivity and amphetamine responses in a model of ADHD, *Neurobiology of disease*, 37(1), 228–236. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.10.009.D2>

Fon, E.; Pothos, E.; Sun, B.; Killeen, N.; Sulzer, D.; Edwards, R. (1997). Vesicular Transport Regulates Monoamine Storage and Release but Is Not Essential for

Amphetamine Action, *Neuron*19, 1271–1283.[http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80418-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80418-3)

Fu, M.; Holzbaaur, E. (2013). JIP1 regulates the directionality of APP axonal transport by coordinating kinesin and dynein motors. *The Journal of Cell Biology*, 202(3), 495–508. <http://doi.org/10.1083/jcb.201302078>

Fujiyama, F.; Sohn, J.; Nakano, T.; Furuta, T.; Nakamura, K.; Matsuda, W.; Kaneko, T. (2011). Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: a single neuron-tracing study using a viral vector. *The European Journal of Neuroscience*, 33(4), 668–77. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07564.x>

Gao, F.; Hebbar, S.; Gao, X.; Alexander, M.; Pandey, J.; Walla, M.; Cotham, W.; King, S.; Smith, D. (2015). GSK-3 $\beta$  Phosphorylation of Cytoplasmic Dynein Reduces Ndel1 Binding to Intermediate Chains and Alters Dynein Motility. *Traffic*, 16(9), 941–961. <http://doi.org/10.1111/tra.12304>

Gerfen, C.; Engber, T.; Mahan, L.; Susel, Z.; Chase, T.; Monsma, F.; Sibley, D. (1990). D1 and D2 Dopamine Receptor-Regulated Gene Expression of Striatonigral and Striatopallidal Neurons dopamine, 134(1986), 1986–1989.

Gerfen, C.; Miyachi, S.; Paletzki, R.; Brown, P. (2002). D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *The Journal of Neuroscience*, 22(12), 5042–5054. <http://doi.org/22/12/5042> [pii]

Gerfen, C.; Surmeier, D. (2011). Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine, *Annual Review of Neuroscience*(April), 441–466. <http://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>

Gibbs, K.; Greensmith, L.; Schiavo, G. (2015). Regulation of Axonal Transport by Protein Kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(10), 597–610. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.08.003>

Giráldez-Pérez, R.; Antolín-Vallespín, M.; Muñoz, M.; Sánchez-Capelo, A. (2014). Models of  $\alpha$ -synuclein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1), 176. <http://doi.org/10.1186/s40478-014-0176-9>

Goedert, M.; Crowther, R.; Garner, C. (1991). Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2, *Trends in neuroscience* Volume 14, Issue 5 251–252. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236\(91\)90105-4](http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(91)90105-4)

Greengard, P. (2001). The Neurobiology of Dopamine Signaling. *Archives of Neurology*, 61(5), 641. <http://doi.org/10.1001/archneur.61.5.641>

Guillaud, L.; Setou, M.; Hirokawa, N. (2003). KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(1), 131–140. <http://doi.org/23/1/131> [pii]

Hafezparast, M.; Klocke, R.; Ruhrberg, C.; Marquardt, A.; Ahmad-Annuar, A.; Bowen, S.; Lalli, G.; Witherden, A.; Hummerich, H.; Nicholson, S.; Morgan, P.; Oozageer, R.; Priestley, J.; Averill, S.; King, V.; Ball, S.; Peters, J.; Toda, T.; Yamamoto, A.; Hiraoka,

Y.;Augustin, M.;Korthaus, D.;Wattler, S.;Wabnitz, P.;Dickneite, C.;Lampel, S.; Boehme, F.;Peraus, G.;Popp, A.;Rudelius, M.;Schlegel, J.;Fuchs, H.;Hrabe de Angelis, M.;Schiavo, G.;Shima, D.;Russ, A.;Stumm, G.;Martin, J.;Fisher, E. (2003). Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science (New York, N.Y.)*, *300*(5620), 808–12. <http://doi.org/10.1126/science.1083129>

Haggerty, T.; Credle, J.; Rodriguez, O.; Wills, J.; Oaks, A.; Masliah, E.; Sidhu, A. (2011). Hyperphosphorylated Tau in an  $\alpha$ -synuclein overexpressing transgenic model of Parkinson's disease. *The European Journal of Neuroscience*, *33*(9), 1598–1610. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07660.x>

Halpain, S.; Dehmelt, L. (2006). Protein family review The MAP1 family of microtubule-associated proteins, *Genome Biology*, *7*(6), 224. <http://doi.org/10.1186/gb-2006-7-6-224>

Harada, A.; Takei, Y.; Kanai, Y.; Tanaka, Y.; Nonaka, S.; Hirokawa, N. (1998). Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *Journal of Cell Biology*, *141*(1), 51–59. <http://doi.org/10.1083/jcb.141.1.51>

Hegarty, S.; Sullivan, A.; O'Keeffe, G. (2013). Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Developmental Biology*, *379*(2), 123–138. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.014>

Hemmings, H.; Greengard, P.; Tung, H.; Cohen, P. (1984). DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature*, *310*(5977), 503–505. <http://doi.org/10.1038/310503a0>

Hirokawa, N. (1998). Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport. *Science*, 279(January 1998), 519–26. <http://doi.org/10.1126/science.279.5350.519>

Hirokawa, N.; Niwa, S.; Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*, 68(4), 610–38. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.039>

Hollenbeck, P.; Saxton, W. (2005). The axonal transport of mitochondria. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 23):5411-5419. doi:10.1242/jcs.02745. <http://doi.org/10.1242/jcs.02745>

Ishikawa, S.; Taira, T.; Niki, T.; Takahashi-Niki, K.; Maita, C.; Maita, H.; Ariga, H.; Iguchi-Ariga, S. (2009). Oxidative status of DJ-1-dependent activation of dopamine synthesis through interaction of tyrosine hydroxylase and 4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) decarboxylase with DJ-1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(42), 28832–28844. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.019950>

Isojima, H.; Lino, R.; Niitani, Y.; Noji, H.; Tomishige, M. (2016). The stepping motion of kinesin-1. *Nature Chemical Biology*, (February), 1–9. <http://doi.org/10.1038/nchembio.2028>

Ittner, L.; Fath, T.; Ke, Y.; Bi, M.; Eersel, J.; Li, K.; & Gunning, P. (2008). Parkinsonism and impaired axonal transport in a mouse model of frontotemporal dementia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), 15997–16002. <http://doi.org/10.1073/pnas.0808084105> (15).

Jacobson, C.; Schnapp, B.; Banker, G. (2006). A Change in the Selective Translocation of the Kinesin-1 Motor Domain Marks the Initial Specification of the Axon, 797–804. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.005>

Jensen. (1999). Axonal transport of synucleins is mediated by all rate components. *European Journal of Neuroscience*, 11(10), 3369–3376. <http://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00754.x>

Jensen, P.; Nielsen, M.; Jakes, R.; Dotti, G.; Goedert, M. (1998). Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial parkinsons-disease mutation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26292–26294. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26292>

Junco, A.; Bhullar, B.; Tarnasky, H.; van der Hoorn, F. (2001). Kinesin light-chain KLC3 expression in testis is restricted to spermatids. *Biology of Reproduction*, 64(5), 1320–30.

Kalyanasundar, B.; Perez, C.; Luna, A.; Solorio, J.; Moreno, M.; Elias, D.; Simon, S.; Gutierrez, R. (2015). D1 and D2 antagonists reverse the effects of appetite suppressants on weight loss, food intake, locomotion, and rebalance spiking inhibition in the rat NAc shell. *Journal of Neurophysiology*, 114(1), 585–607. <http://doi.org/10.1152/jn.00012.2015>

Kamal, A.; Stokin, G.; Yang, Z.; Xia, C.; Goldstein, L. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron*, 28(2), 449–59. [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00124-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00124-0)



Kanai, Y.; Dohmae, N.; Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: Isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, 43(4), 513–525. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.022>

Kanai, Y.; Okada, Y.; Tanaka, Y.; Harada, A.; Terada, S.; Hirokawa, N. (2000). KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(17), 6374–84.

Kapitein, L.; Hoogenraad, C. (2011). Molecular and Cellular Neuroscience Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(1), 9–20. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.08.015>

Kelly MA, Low MJ, Rubinstein M, Phillips TJ. (2008) Role of dopamine D1-like receptors in methamphetamine locomotor responses of D2 receptor knockout mice. *Genes, brain, and behavior*. 2008;7(5):568-577. doi:10.1111/j.1601-183X.2008.00392.x.

Kelly, M.; Rubinstein, M.; Phillips, T.; Lessov, C.; Burkhart-kasch, S.; Zhang, G.; Bunzow, J.; Fang, Y.; Gerhardt, G.; Grandy, D.; Low, M. (1998). Locomotor Activity in D2 Dopamine Receptor-Deficient Mice Is Determined by Gene Dosage , *Genetic Background* , and *Developmental Adaptations*, 18(9), 3470–3479.

Konradi, C.; Cole, R. (1994). Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB. *The Journal of Neuroscience*, 14(9), 5623–5634. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/14/9/5623.short>

Kravitz, A.; Freeze, B.; Parker, P.; Kay, K.; Myo, T.; Deisseroth, K.; Kreitzer, A. (2013). Regulation of parkinsonian motor behaviors by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466(7306), 622–626. <http://doi.org/10.1038/nature09159>

Lacovich, V.; Espindola, S.; Alloatti, M.; Devoto, V. P.; Cromberg, L.; Forte, G.; Gallo, J.; Bruno, L.; Stokin, G.; Avale, M.; Falzone, T. (2017). Tau Isoforms Imbalance Impairs the Axonal Transport of the Amyloid Precursor Protein in Human Neurons, *Journal of Neuroscience* 4 January 2017, 37 (1) 58-69; DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2305-16.2017>

Lawrence, C.; Dawe, R.; Christie, K.; Cleveland, D.; Dawson, S.; Endow, S.; Goldstein, L.; Goodson, H.; Hirokawa, N.; Howard, J.; Malmberg, R.; McIntosh, J.; Miki, H.; Mitchison, T.; Okada, Y.; Reddy, A.; Saxton, W.; Schliwa, M.; Scholey, J.; Vale, R.; Walczak, C.; Wordeman, L. (2004). A standardized kinesin nomenclature. *The Journal of Cell Biology*, 167(1), 19–22. <http://doi.org/10.1083/jcb.200408113>

Lechardeur, D.; Reibaud, M.; Laduron, P. (1993). Axonal Transport of Dopamine-containing Vesicles Labelled. *Neuroscience*, 5(December 1992), 449–453.

Lee, H.; Kang, S.; Lee, K.; Im, H. (2011). Human  $\alpha$ -synuclein modulates vesicle trafficking through its interaction with prenylated Rab acceptor protein 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412(4), 526–531. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.028>

Lee, S.; So, C.; Rashid, A.; Varghese, G.; Cheng, R.; Lança, A.; O'Dowd, W.; George, S. (2004). Dopamine D1 and D2 receptor co-activation generates a novel phospholipase

C-mediated calcium signal. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35671–35678.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.M401923200>

Leterrier, C.; Dargent, B. (2014). No Pasaran! Role of the axon initial segment in the regulation of protein transport and the maintenance of axonal identity. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 27, 44–51. <http://doi.org/10.1016/j.semcd.2013.11.001>

Lipkind, D.; Sakov, A.; Kafkafi, N.; Elmer, G.; Benjamini, Y.; Golani, I. (2004). New replicable anxiety-related measures of wall vs . center behavior of mice in the open field, *Journal of Applied Physiology* Vol. 97 no. 1, 347-359 DOI: 10.1152/jappphysiol.00148.2004

Lister, R. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse, *Psychopharmacology* 92: 180doi:10.1007/BF00177912

Liu, F. C.; Graybiel, A. M. (1996). Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: Transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum. *Neuron*, 17(6), 1133–1144. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80245-7](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80245-7)

Liu, M.; Liu, Y.; Hou, B.; Bu, D.; Shi, L.; Gu, X.; Ma, Z. (2015). Kinesin superfamily protein 17 contributes to the development of bone cancer pain by participating in NR2B transport in the spinal cord of mice. *Oncology Reports*, 33(3), 1365–1371. <http://doi.org/10.3892/or.2015.3706>

Lledo, P.; Homburger, V.; Bockaert, J.; Vincent, J. (1992). Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptors to K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron*, 8(3), 455–463. [http://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90273-G](http://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90273-G)

Lohr, K.; Miller, G. (2015) VMAT2 and Parkinson's disease:harnessing the dopamine vesicle. *Expert review of neurotherapeutics*14(10), 1115–1117. <http://doi.org/10.1586/14737175.2014.960399>.

Lu, X.; Kim-Han, J.; Harmon, S.; Sakiyama-Elbert, S.; O'Malley, K. (2014). The Parkinsonian mimetic, 6-OHDA, impairs axonal transport in dopaminergic axons. *Molecular Neurodegeneration*, 9, 17. <http://doi.org/10.1186/1750-1326-9-17>

Lundblad, M.; Decressac, M.; Mattsson, B.; Björklund, A. (2012). Impaired neurotransmission caused by overexpression of  $\alpha$ -synuclein in nigral dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(9), 3213–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.1200575109>

Madisen, L.; Zwingman, T.; Sunkin, S.; Oh, S; Hatim, A.; Gu, H.;Ng, L.; Palmiter, R.; Hawrylycz, M.; Jones, A.; Lein, E.; Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature Neuroscience*, 13(1), 133–140. <http://doi.org/10.1038/nn.2467>

Maroteaux, L.; Campanelli, J.; & Scheller, R. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(8), 2804–2815.

Masocha, W.; Kombian, S.; Edafiogho, I.(2016). Evaluation of the antinociceptive activities of enaminone compounds on the formalin and hot plate tests in mice. *Scientific Reports*, 6(August 2015), 21582. <http://doi.org/10.1038/srep21582>

McDougall, S.; Reichel, C.; Cyr, M.; Karper, P.; Nazarian, A; Crawford, C. (2005). Importance of D(1) receptors for associative components of amphetamine-induced behavioral sensitization and conditioned activity: a study using D(1) receptor knockout mice. *Psychopharmacology*, 183(1), 20–30. <http://doi.org/10.1007/s00213-005-0146-9>

Meiser, J.; Weindl, D.; Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 11(1), 34. <http://doi.org/10.1186/1478-811X-11-34>

Melemedjian, O.; Tillu, D.; Moy, J.; Asiedu, M.; Mandell, E.; Ghosh, S.;Dussor, G.; Price, T. (2014). Local translation and retrograde axonal transport of CREB regulates IL-6-induced nociceptive plasticity. *Molecular Pain*, 10(1), 45. <http://doi.org/10.1186/1744-8069-10-45>

Michel, P.; Hirsch, E.; Hunot, S. (2016). Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron*, 90(4), 675–691. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.038>

Mink, J. (2003). The Basal Ganglia and Involuntary Movements. Impaired inhibition of competing motor patterns, *Neurological Review*,. 60(10):1365-1368. [doi:10.1001/archneur.60.10.1365](http://doi.org/10.1001/archneur.60.10.1365)

Mooslehner, K.; Chan, P.; Xu, W., Liu, L.; Smadja, C.; Humby, T.; Allen, N.; Wilinon, L.; Emson, P. (2001). Mice with Very Low Expression of the Vesicular Monoamine Transporter 2 Gene Survive into Adulthood: Potential Mouse Model for Parkinsonism. *Mol Cell Biol*, 21(16), 5321–5331. <http://doi.org/10.1128/MCB.21.16.5321>

Morfini, G.; Pigino, G.; Opalach, K.; Serulle, Y.; Moreira, J.; Sugimori, M.; Llinás, R.; Brady, S. (2007). 1-Methyl-4-phenylpyridinium affects fast axonal transport by activation of caspase and protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2442–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0611231104>

Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., Ratner, N., & Brady, S. T. (2002). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO Journal*, 21(3), 281–293. <http://doi.org/10.1093/emboj/21.3.281>

Nakajima, K.; Yin, X.; Takei, Y.; Seog, D.; Homma, N.; Hirokawa, N. (2012). Molecular motor KIF5A is essential for GABA(A) receptor transport, and KIF5A deletion causes epilepsy. *Neuron*, 76(5), 945–61. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.012>

Nambu, A.; Tokuno, H.; Takada, M. (2002). Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal “ hyperdirect ” pathway, *Neuroscience Research* 43, 111–117. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00027-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00027-5)

Nemani, V.; Lu, W.; Berge, V.; Nakamura, K.; Onoa, B.; Lee, M.; Chaudhry, F.; Nicoll, R.; Edwards, R. (2010). Increased Expression of Alpha-Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering After Endocytosis. *Neuron*, 65(1), 66–79. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.023>

Neve, K.; Seamans, J.; & Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine receptor signaling. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 24(3), 165–205. <http://doi.org/10.1081/LRST-200029981>

Niwa, S.; Tanaka, Y.; Hirokawa, N. (2008). KIF1Bbeta- and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD. *Nature Cell Biology*, 10(11), 1269–1279. <http://doi.org/10.1038/ncb1785>

Okada, Y.; Yamazaki, H.; Sekine-Aizawa, Y.; Hirokawa, N. (1995). The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell*, 81(5), 769–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7539720>

Osterhaus, A.; Groen, J.; Bildt, M.; Van De Martina, B.; Vos, J.; Egmond, H. Van. (1997).  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies Endogenous proviruses as “mementos”? 839–840.

Otero, M.; Alloatti, M.; Cromberg, L.; Almenar-Queralt, A.; Encalada, S.; Pozo Devoto, V.; Bruno, L.; Goldstein, L.; Falzone, T. (2014). Fast axonal transport of the proteasome complex depends on membrane interaction and molecular motor function. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 7), 1537–49. <http://doi.org/10.1242/jcs.140780>

Perez, R.; Waymire, J.; Lin, E.; Liu, J.; Guo, F.; Zigmond, M. (2002). A role for  $\alpha$ -synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis. *The Journal of Neuroscience*, 22(8), 3090–3099. <http://doi.org/20026307>

Perez, X.; Parameswaran, N.; Huang, L.; O'Leary, K.; Quik, M. (2008). Pre-synaptic dopaminergic compensation after moderate nigrostriatal damage in non-human primates. *Journal of Neurochemistry*, 105(5), 1861–1872. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05268.x>

Pigino, G.; Morfini, G.; Pelsman, A.; Mattson, M.; Brady, S.; Busciglio, J. (2003). Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(11), 4499–508. <http://doi.org/23/11/4499> [pii]

Prots, I.; Veber, V.; Brey, S.; Campioni, S.; Buder, K.; Riek, R.; Bohm, K.; Winner, B. (2013).  $\alpha$ -Synuclein Oligomers Impair Neuronal Microtubule-Kinesin Interplay. *Journal of Biological Chemistry*, 288(30), 21742–21754. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.451815>

Puls, I.; Jonnakuty, C.; LaMonte, B.; Holzbaur, E.; Tokito, M.; Mann, E., Floeter, M.; Bidus, K.; Drayna, D.; Oh, S.; Brown, R.; Ludlow, C.; Fischbeck, K. H. (2003). Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nature Genetics*, 33(4), 455–456. <http://doi.org/10.1038/ng1123>

Qian, W.; Liu, F. (2014). Regulation of alternative splicing of tau exon 10. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 367–377. <http://doi.org/10.1007/s12264-013-1411-2>

Rahman, A.; Friedman, D.; Goldstein, L. (1998). Two Kinesin Light Chain Genes in Mice. Identification and characterization of the encoded proteins, *The Journal of Biological Chemistry*.273(25), 15395–15403. doi: 10.1074/jbc.273.25.15395



Redgrave, P.; Prescott, T.; Gurney, K. (1999). The basal ganglia: A vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience*, 89(4), 1009–1023. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00319-4](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00319-4)

Ren, Y.; Liu, W.; Jiang, H.; Jiang, Q.; Feng, J. (2005). Selective Vulnerability of Dopaminergic Neurons to Microtubule Depolymerization, *The Journal of Biological Chemistry* 280(40), 34105–34112. <http://doi.org/10.1074/jbc.M503483200>

Roy, S.; Winton, M.; Black, M.; Trojanowski, J.; Lee, V. (2007). Rapid and intermittent cotransport of slow component-b proteins. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(12), 3131–8. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4999-06.2007>

Saha, A.; Hill, J.; Utton, M.; Asuni, A.; Ackerley, S.; Grierson, A.; Miller, C.; Davies, A.; Buchman, V.; Anderton, B.; Hanger, D. (2004). Parkinson's disease alpha-synuclein mutations exhibit defective axonal transport in cultured neurons. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 7), 1017–24. <http://doi.org/10.1242/jcs.00967>

Santini, E.; Valjent, E.; Fisone, G. (2008). Parkinson's disease: Levodopa-induced dyskinesia and signal transduction. *FEBS Journal*, 275(7), 1392–1399. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06296.x>

Schmidt, M. R., Maritzen, T., Kukhtina, V., Higman, V. a, Doglio, L., Barak, N. N., ... Haucke, V. (2009). Regulation of endosomal membrane traffic by a Gadkin/AP-1/kinesin KIF5 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15344–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.0904268106>

Setou, M.; Seog, D.; Tanaka, Y.; Kanai, Y.; Takei, Y.; Kawagishi, M.; Hirokawa, N. (2002). Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature*, 417(6884), 83–87. <http://doi.org/10.1038/nature743>

Sharp, T.; Zetterström, T.; Ljungberg, T.; Ungerstedt, U. (1987). A direct comparison of amphetamine-induced behaviours and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. *Brain Research*, 401(2), 322–330. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91416-8](http://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91416-8)

Sheng, Z.; Cai, Q. (2012). Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(2), 77–93. <http://doi.org/10.1038/nrn3156>

Shulman, J.; De Jager, P.; Feany, M. B. (2011). Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annual Review of Pathology*, 6, 193–222. <http://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130242>

Spillantini, M.; Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology*, 12(6), 609–622. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70090-5](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5)

Spillantini, M.; Schmidt, M.; Lee, V.; Trojanowski, J.; Jakes, R.; Goedert, M. (1997).  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies, *Nature* 388, 839-840.

Starr, B; Starr, M. (1986). Differential effects of dopamine D1 and D2 agonists and antagonists on velocity of movement, rearing and grooming in the mouse. Implications for the roles of D1 and D2 receptors., *Neuropharmacology* 25(5) :455-63..

Stokin, G.; Goldstein, L. (2006). Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 607–27.

<http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142637>

Su, Y.; Si, T.; Zhou, D.; Guo, C.; Wang, X.; Yang, Y.; Shu, L.; Liang, J. H. (2007). Risperidone attenuates MK-801-induced hyperlocomotion in mice via the blockade of serotonin 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors. *European Journal of Pharmacology*, 564(1-3), 123–130. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.02.031>

Su, Y.; Ye, M.; Li, L.; Liu, C.; Pan, J.; Liu, W.; Jiang, Y.; Jiang, X.; Zhang, X.; Shu, Y.; Bao, L. (2013). KIF5B promotes the forward transport and axonal function of the voltage-gated sodium channel Nav1.8. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(45), 17884–96. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0539-13.2013>

Tanaka, Y.; Kanai, Y.; Okada, Y.; Nonaka, S.; Takeda, S.; Harada, A.; Hirokawa, N. (1998). Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell*, 93(7), 1147–58. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81459-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81459-2)

Taverna, S.; Ilijic, E.; Surmeier, D. (2008). Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(21), 5504–5512. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5493-07.2008>

Tecuapetla, F.; Koós, T.; Tepper, J.; Kabbani, N.; Yeckel, M.; (2009). Differential Dopaminergic Modulation of Neostriatal Synaptic Connections of Striatopallidal Axon Collaterals. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(28), 8977–8990. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6145-08.2009>

Teuling, E.; van Dis, V.; Wulf, P.; Haasdijk, E.; Akhmanova, A.; Hoogenraad, C.; Jaarsma, D. (2008). A novel mouse model with impaired dynein/dynactin function develops amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like features in motor neurons and improves lifespan in SOD1-ALS mice. *Human Molecular Genetics*, 17(18), 2849–2862. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddn182>

Tewari, A.; Jog, R.; Jog, M. (2016). The Striatum and Subthalamic Nucleus as Independent and Collaborative Structures in Motor Control. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 10, 17. <http://doi.org/10.3389/fnsys.2016.00017>

Tiberi, M.; Jarvie, K.; Silvia, C.; Falardeau, P.; Gingrich, J.; Godinot, N.; Bertrand, L.; Yang-Feng, T.; Fremeau, R.; Caron, M. (1991). Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), 7491–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52326&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Tronche, F.; Kellendonk, C.; Kretz, O.; Gass, P.; Anlag, K.; Orban, P.; Bock, R.; Klein, R.; Schütz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nature Genetics*, 23(1), 99–103. <http://doi.org/10.1038/12703>

Twelvetrees, A.; Yuen, E.; Arancibia-carcamo, I.; Andrew, F.; Rostaing, P.; Lumb, M.; Humbert, S.; Triller, A.; Saudou, F.; Yan, Z.; Kittler, J. (2010). Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron*, 65(1), 53–65. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.007>

Usiello, A.; Baik, J.; Rougé-Pont, F.; Picetti, R.; Dierich, A.; LeMeur, M.; Piazza, P.; Borrelli, E. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors, *Nature* 408, 199-203. <https://dx.doi.org/10.1038/35041572>

Van Der Kooy, D.; Weinreich, P.; Nagy, J. (1986). Dopamine and opiate receptors: Localization in the striatum and evidence for their axoplasmic transport in the nigrostriatal and striatonigral pathways. *Neuroscience*, 19(1), 139–146. [http://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90011-4](http://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90011-4)

Van Spronsen, M.; Mikhaylova, M.; Lipka, J.; Schlager, M.; van den Heuvel, D.; Kuijpers, M.; Wulf, P.; Keijzer, N.; Demmers, J.; Kapitein, L.; Jaarsma, D.; Gerritsen, H.; Akhmanova, A.; Hoogenraad, C. (2013). TRAK/Milton motor-adaptor proteins steer mitochondrial trafficking to axons and dendrites. *Neuron*, 77(3), 485–502. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.027>

Watt, D.; Dixit, R.; Cavalli, V. (2015). JIP3 Activates Kinesin-1 Motility to Promote Axon Elongation. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(25), 15512–25. <http://doi.org/10.1074/jbc.M115.651885>

Wilson, J.; Systems, N. (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin , *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 70(October).10 (10) 3421-3438

Winding, M.; Kelliher, M.; Lu, W.; Wildonger, J.; Gelfand, V. (2016). Role of kinesin-1–based microtubule sliding in *Drosophila* nervous system development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201522416. <http://doi.org/10.1073/pnas.1522416113>

Wu, Y.; Richard, S.; Parent, A. (2000). The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neuroscience Research*, 38(1), 49–62. [http://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00140-1](http://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00140-1)

Xia, C.; Roberts, E.; Her, L.; Liu, X.; Williams, D.; Cleveland, D.; Goldstein, L. (2003). Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *Journal of Cell Biology*, 161(1), 55–66. <http://doi.org/10.1083/jcb.200301026>

Xia, C.; Rahman, A.; Yang, Z.; Goldstein, L. (1998). Chromosomal Localization Reveals Three Kinesin Heavy Chain Genes in Mouse, 213, 209–213.

Xia, C.; Roberts, E.; Her, L.; Liu, X.; Williams, D.; Cleveland, D.; Goldstein, L. (2003). Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *The Journal of Cell Biology*, 161(1), 55–66. <http://doi.org/10.1083/jcb.200301026>

Xu, M.; Moratalla, R.; Gold, L.; Hiroi, N.; Koob, G.; Graybiel, A.; (1994). Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses, *Cell*79, 729–742.[http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90557-6](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90557-6)

Xu, R.; Hranilovic, D.; Fetsko, L.; Bucan, M.; Wang, Y. (2002). Dopamine D2S and D2L receptors may differentially contribute to the actions of antipsychotic and psychotic agents in mice. *Molecular Psychiatry*, 7(10), 1075–82. <http://doi.org/10.1038/sj.mp.4001145>

Yamamoto H.; Demura T.; Morita M.; Banker G.; Tanii T.; Nakamura S. (2012) Differential neurite outgrowth is required for axon specification by cultured hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry*.;123(6):904-910. doi:10.1111/jnc.12001.

Yonekawa, V.; Harada, A.; Okada, Y.; Funakoshi, T.; Kanai, Y.; Takei, Y.; Terada, S.; Noda, T.; Hirokawa, N. (1998). Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, 141(2), 431–441. <http://doi.org/10.1083/jcb.141.2.431>

Zhao, C.; Takita, J.; Tanaka, Y.; Setou, M.; Nakagawa, T.; Takeda, S.; Hirokawa, N. (2001). Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell*, 105(5), 587–97. [http://doi.org/S0092-8674\(01\)00363-4](http://doi.org/S0092-8674(01)00363-4)