



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**PAPEL DE CDK5 EN LA MODULACIÓN DOPAMINÉRGICA  
DE LA PLASTICIDAD ESTRIATAL EN UN MODELO  
MURINO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**Presenta:**

**Q.F.B. JORGE ALBERTO MIRANDA BARRIENTOS**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray (FES-Iztacala)**

**Comité tutor:**

**Dr. José Bargas Díaz (I.F.C)**

**Dr. Froylan Gómez Lagunas (Facultad de Medicina)**

**C.D. DE MÉXICO ENERO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este proyecto de investigación así como la escritura de esta tesis fueron realizados gracias a los apoyos obtenidos por parte del CONACYT (proyecto: 180660, proyecto: 81062) PAPIIT (IN220811) y el COMECYT

## Índice

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	3
3. Abstract	5
4. Marco teórico	7
a. Ganglios basales	7
i. Núcleo estriado	9
ii. Tipos de Neuronas en el estriado	10
1. Neuronas de proyección Neuronas Espinosas Medianas	10
2. Tipos de conexiones de las Neuronas Espinosas Medianas	11
3. Interneuronas estriatales	11
4. Conexiones de interneuronas estriatales	12
iii. Núcleo estriado y control del movimiento	12
b. Plasticidad a Largo plazo	14
i. Mecanismos generales de LTP	14
ii. Mecanismos generales de LTD	16
iii. Plasticidad sináptica a largo plazo en el núcleo estriado	17
iv. LTD corticoestriatal	17
v. LTP corticoestriatal	19
c. Cinasa dependiente de ciclinas 5 Cdk5	20
i. Cdk5 y liberación de neurotransmisor	22
ii. Cdk5 y modulación de receptores NMDA	24
iii. Cdk5 y señalización dopaminérgica	24
iv. Cdk5 y plasticidad sináptica	25
v. Cdk5 y enfermedades neurodegenerativas	26
d. Enfermedad de Huntington	27
i. Alteraciones plásticas en la enfermedad de Huntington	30
5. Justificación	32
6. Hipótesis	33
7. Objetivos	33
8. Metodología	34
a. Tratamiento de animales	34
b. Registro electrofisiológico	34
i. Obtención de rebanadas	34
ii. Registro de campo	34
iii. Registro unicelular en fijación de voltaje	35
iv. Curva intensidad amplitud	36
v. Protocolo de estimulación a alta frecuencia	36
c. Western blot	36
i. Obtención de proteínas	36
ii. Electroforesis y transferencia	37
iii. Inmunodetección	37
9. Resultados	38
a. El inhibidor de la Cdk5 Roscovitine incrementa la inducción de la LTP en las sinapsis corticoestriatales	38
i. El LTD es el tipo de plasticidad sináptica más común en el estriado	38
ii. La inhibición de la Cdk5 modula la transmisión corticoestriatal y	

favorece la inducción de la LTP	38
iii. El favorecimiento de la LTP producido por la inhibición de la Cdk5 depende de la activación de receptores dopaminérgicos	42
iv. La vía PKA/DARPP-32 participa en el mecanismo por el cual la inhibición de la Cdk5 favorece la LTP	42
v. Canales de calcio tipo L y receptores NMDA participan en el favorecimiento de la LTP por la inhibición de la Cdk5	47
vi. El favorecimiento de la LTP se da en las dos subpoblaciones de neuronas espinosas medianas	49
vii. El cambio de LTD a LTP por la inhibición de la Cdk5 tiene un componente presináptico y postsináptico	52
b. Alteraciones en la plasticidad sináptica corticoestriatal tras la inhibición del complejo 2: implicaciones de la Cdk5	54
i. La administración subcrónica de 3-NP causa alteraciones en la transmisión y plasticidad sináptica en el estriado	54
ii. La administración de 3-NP produce un incremento en la expresión de la Cdk5	54
iii. La administración de 3-NP incrementa la fosforilación de DARPP 32	54
iv. La inhibición de la Cdk5 no restaura la plasticidad sináptica	58
v. La inhibición de la Cdk5 produce un LTP moderado que no depende la activación de receptores D1 pero sí de la actividad de la PKA	58
10. Discusión	62
a. Papel de la Cdk5 en la plasticidad corticoestriatal en condiciones fisiológicas normales	62
b. Papel de la Cdk5 en la plasticidad corticoestriatal en un modelo de la EH	67
11. Conclusiones	72
12. Artículo publicado	73
13. Referencias	88

## Abreviaturas

3-NP.- Ácido 3 Nitropropiónico

6OHDA.- 6 Hidroxi-dopamina

AKT.- Proteína cinasa B

AMPA.- Ácido  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionico

AMPc.-Adenosin-monofosfato cíclico

BDNF.- Factor neurotrófico derivado del cerebro

CAG.- Citosina Adenina Guanina

CB1.- Receptor a canabinoide 1

Cdk5.- Cinasa dependiente de ciclinas 5

CREB.- Elemento unidor que responde a AMPc

DA.- Dopamina

DARPP-32.- Fosfoproteína activada por dopamina y AMP cíclico de 32 KDa de peso

DMSO.- Dimetil sulfóxido

EAF.- Estimulación de alta frecuencia

EH.- Enfermedad de Huntington

ERK.- Cinasa regulada por señales extracelulares

FPP.- Facilitación por pulso pareado

GFP.- Proteína Fluorescente Verde

Gi.- Proteína G inhibidora

Gpi.- Globo pálido interno

Gs.- Proteína G estimuladora

HTT.- Huntingtina

HTTm.- Huntingtina mutada

IT15.- Transcrito interesante 15

LTD.- Depresión a largo plazo

LTP.- Potenciación a largo plazo

MAPK.- Proteína cinasa activada por mitógeno

NEM.- Neuronas espinosas medianas

NMDA.- N-Metil-D-Aspartato

NOS.- Óxido Nítrico

PBS.- Solución buffer de fosfatos

PKA.- Proteína cinasa A

PKG.- Proteína cinasa G

PP1.- Proteína fosfatasa 1

PP2B.- Proteína fosfatasa 2B

PPT.- Potenciación post tetánica

PSD 95.- Proteína de la densidad postsináptica de 95 KDa de peso

Rosc.- Roscovitine

SN.- Sustancia Nigra

SNC.- Sistema nervioso central

STDP.- Plasticidad sináptica basada en la coincidencia de la espiga

TRK.- Receptor tirosina cinasa

## **Resumen:**

La cinasa dependiente de ciclinas 5 (Cdk5) es una proteína cinasa altamente expresada en el sistema nervioso central (SNC). La activación de la Cdk5 depende de su unión con sus activadores p35 y p39. Hasta la fecha se conocen al menos 20 proteínas que son fosforiladas por la Cdk5, relacionándola con múltiples procesos fisiológicos en el sistema nervioso como la diferenciación neuronal, migración neuronal, liberación de neurotransmisor, señalización dopaminérgica y plasticidad sináptica, entre otros. Una de las regiones en donde se encuentra altamente expresada la Cdk5 es el núcleo estriado, donde se ha encontrado que la Cdk5 modula la transmisión glutamatérgica y dopaminérgica en las neuronas espinosas medianas.

Además de sus acciones fisiológicas en el SNC, se ha descrito que la Cdk5 participa en la etiología de procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington (EH). Esta última es una enfermedad hereditaria autosómica dominante causada por la inserción de tripletes (CAG) repetidos en el gen IT15 que transcribe para una proteína llamada Huntingtina. Una de las características más importantes de la EH es la muerte de las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado. Reportes recientes han mostrado que existe un incremento en la actividad de la Cdk5 en el núcleo estriado en diferentes modelos de la EH, se cree que este incremento es importante para los procesos degenerativos ocurridos en las neuronas espinosas medianas durante la EH.

En la EH, existen alteraciones en la plasticidad sináptica de las neuronas espinosas medianas, en especial se ha encontrado que existe un cambio en el tipo de plasticidad sináptica inducido en las sinapsis glutamatérgicas corticoestriatales después de un tren de estimulación de alta frecuencia (EAF). En condiciones normales, el tipo de plasticidad observado después de un protocolo de estimulación de alta frecuencia es la depresión a largo plazo (LTD por sus siglas en inglés). Sin embargo, en diferentes modelos de la EH se ha reportado que el tipo de plasticidad inducido es la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés). La LTP observada en estos modelos puede generar excitotoxicidad por la alta cantidad de calcio que entra a la célula y llevar a la muerte neuronal. Hasta la fecha no se conocen con precisión los mecanismos responsables del cambio de plasticidad en el estriado. Sin embargo, se sabe que ambos tipos de plasticidad son modulados por la activación de los receptores dopaminérgicos así, es posible que modificaciones en la señalización de estos receptores sean las responsables del cambio en el tipo de plasticidad sináptica.

La Cdk5 modula la señalización dopaminérgica a través de fosforilar a la fosfoproteína DARPP- 32. La fosforilación de DARPP-32 por la Cdk5 inhibe la señalización de los receptores D1, asimismo, se ha reportado que la activación de receptores dopaminérgicos modulan la expresión y actividad de la Cdk5. Por otra parte, se sabe que la Cdk5 participa en procesos de plasticidad sináptica en regiones del SNC. Debido a lo anterior, es posible que la Cdk5 module los procesos de plasticidad sináptica estriatal a través de la modulación de la señalización dopaminérgica, y que el incremento en la actividad de la Cdk5 en modelos de la EH origine alteraciones en la expresión de la plasticidad sináptica en el estriado.

En este trabajo se evaluó el papel de la Cdk5 en la plasticidad de las sinapsis corticoestriatales en condiciones fisiológicas normales y en un modelo farmacológico de la EH generado por la inhibición del complejo II mitocondrial.

Los resultados mostraron que en condiciones fisiológicas normales, la Cdk5 modula la plasticidad sináptica, ya que su inhibición favorece la inducción de LTP. La LTP obtenida a través de la inhibición de la Cdk5 es sensible a la activación de receptores dopaminérgicos, la actividad de la PKA, los canales de calcio tipo L y de los receptores NMDA. Así mismo, se encontró que la LTP inducida por la inhibición de la Cdk5, tiene un componente postsináptico mediado por la PKA. La LTD en cambio, exhibe un componente presináptico para su inducción. Por otra parte, en un modelo de la EH basado en la administración del ácido 3-Nitropropiónico (3-NP), se encontró un incremento en la expresión de la Cdk5 y la pérdida de la LTD acompañada de potenciación postetánica si las células se estimulan con un tren de alta frecuencia. La inhibición de la Cdk5 en estas condiciones como se esperaba no logró restaurar la LTD, por el contrario, produjo un LTP moderado. Por lo que el incremento en la expresión de la Cdk5 parece ser resultados de cambios adaptativos producidos por la pérdida del LTD y no el origen de los cambios plásticos observados en este modelo de la EH.

**Abstract:**

The cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) is a highly expressed protein in the central nervous system (CNS). Cdk5 activation depends on its association with p35 or p39. It has been described at least 20 proteins that can be phosphorylated by Cdk5, and it has been related with multiple physiological processes in the nervous system as neural differentiation, neural migration, neurotransmitter release, dopaminergic signaling and synaptic plasticity. Cdk5 is highly expressed within the striatum, where it has been shown that it exerts a modulatory effect in the glutamatergic and dopaminergic transmission in the medium spiny neurons. Cdk5 has also been related with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Huntington's disease among others.

Huntington's disease (HD) is a dominantly inherited autosomal neurodegenerative disorder caused by the insertion of (CAG) repeats in the IT15 gene that encodes for a protein named Huntingtin. One of the most prominent characteristics in HD is the selective degeneration of the medium spiny neurons of the striatum. Recent reports have shown an increase in cdk5 expression and activity within the striatum in different mouse models of HD. It is believed that this increment in Cdk5 expression is important in the neurodegenerative process of the medium spiny neurons in HD.

In HD, there have been reported synaptic plasticity abnormalities in the medium spiny neurons. In special there is a switch on the type of synaptic plasticity of the corticostriatal glutamatergic synapses after high frequency stimulation (HFS). In normal conditions long term depression (LTD) is the most frequently type of synaptic plasticity in the striatum. However in different models of HD long term potentiation (LTP) but not LTD is the most common type of plasticity. The LTP evoked in these models could lead to the generation of excitotoxicity, by the high amounts of calcium that enters to the cell. Up to date it is not clear the precise mechanism responsible for the switch in the striatal synaptic plasticity. However it is known that both types of plasticity depends on the activation of dopaminergic receptors, so it is possible that changes in this receptors signaling are responsible for the switch of synaptic plasticity.

Cdk5 controls dopaminergic signaling by the phosphorylation of DARPP-32. DARPP-32 phosphorylation by Cdk5 inhibits D1 receptor signaling. It also has been reported that dopamine receptors activation modify Cdk5 expression and activity, moreover it is known that Cdk5 is involve in synaptic plasticity in other CNS. Taking all together it is possible that Cdk5 could participate in

striatal synaptic plasticity by controlling dopaminergic signaling. Moreover, the increase of Cdk5 expression in a mouse model of HD could cause the abnormalities in synaptic plasticity of the corticoestriatal terminals.

This work shows the role of Cdk5 in corticoestriatal plasticity in normal conditions as well as in a pharmacologic mouse model of HD. The results showed that Cdk5 controls synaptic plasticity within the striatum. Cdk5 inhibition favors LTP induction via dopaminergic receptors, PKA activation, L type calcium channels and NMDA receptors. Likewise, the LTP induced by Cdk5 inhibition has a postsynaptic component dependent on PKA activation, instead of LTD that has a presynaptic component.

In the mouse model of HD caused by 3-Nitropropionic acid (3NP) administration, we report an increase of Cdk5 expression and the loss of LTD induction. The loss of LTD is accompanied by the presence of a post tetanic potentiation after HFS. The inhibition of Cdk5 in these circumstances does not restore LTD, on the contrary, as it was expected it produced a moderate LTP. In conclusion the increase of Cdk5 expression in this model of HD does not cause the plastic changes observed at corticoestriatal synapses, instead it may be the result of adaptive changes caused by the loss of LTD.

## Marco teórico

### Ganglios Basales

Los ganglios Basales son un conjunto de estructuras subcorticales relacionadas con la ejecución de programas motores (Marsden, 1980; Marsden, 1981; Cools et al., 1981; Alexander et al., 1990). Las estructuras que forman parte de los ganglios basales son el núcleo estriado (formado por el caudado y el putamen en primates), el globo pálido, el núcleo subtalámico y la sustancia nigra. Se ha encontrado que alteraciones en el funcionamiento de los ganglios basales producen desordenes del movimiento, como los ocurridos en la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson, caracterizados por hipercinesia e hipocinesia respectivamente (Albin et al., 1989; Carlsson et al., 1990; Penney et al., 1983; Wittmann et al., 1993).

El núcleo estriado es la estructura de entrada de información a los ganglios basales (Bolam et al., 2000), mientras que la sustancia nigra (SN) y el globo pálido en su porción interna (GPi), son los núcleos de salida (Parent et al., 1994). Los ganglios basales reciben información proveniente de prácticamente todas las regiones de la corteza y se han propuesto al menos dos modelos de cómo se procesa la información (Alexander et al., 1990; Percheron et al., 1991; Selemon et al., 1991; Parent y Hazrati, 1995). El primer modelo, llamado de procesamiento paralelo, sostiene que diferentes regiones de la corteza cerebral proyectan sobre diferentes regiones del estriado. En el estriado la información se procesa en múltiples circuitos independientes y posteriormente se envía hacia los núcleos de salida, quienes proyectan de regreso a las diferentes regiones de la corteza a través del tálamo (Alexander et al., 1990b Percheron et al., 1991). El segundo modelo, llamado de convergencia supone una gran confluencia de información en el estriado, donde múltiples áreas corticales proyectan y convergen en regiones específicas del estriado, la información es procesada y da origen a una salida única hacia la SN y el GPi (Parent y Hazrati, 1995).

Los núcleos de salida de los ganglios basales (SN y GPi) reciben aferencias del núcleo estriado y del núcleo subtalámico; este último recibe información del estriado a través del globo pálido externo. Estas dos aferencias a los núcleos de salida forman la vía directa e indirecta de los ganglios basales respectivamente (Gerfen et al., 1992). Ambas vías tienen efectos antagónicos sobre la ejecución del movimiento, siendo la vía directa promotora del movimiento mientras que la vía indirecta es inhibitoria. Los núcleos de salida de los ganglios basales proyectan sus axones a los núcleos ventral

anterior, mediodorsal y parafascicular del tálamo, ejerciendo una inhibición tónica de las neuronas talámicas que proyectan a la corteza cerebral (Parent y Hazrati, 1995; Groenewegen., 2003). Además de las proyecciones talámicas a la corteza, el tálamo envía axones de regreso al núcleo estriado, estas proyecciones conforman un sistema de autorregulación de la información en los ganglios basales (Beckstead, 1984, Royce, 1987, Sadikot et al., 1992). Figura 1.

Se ha especulado que los ganglios basales facilitan selectivamente la ejecución de algunos movimientos, mientras inhiben otros (Albin et al., 1989, DeLong et al., 1981, Graybiel, 1995, Hikosaka et al., 2000), de modo análogo a la inhibición lateral (en donde una neurona previamente estimulada, inhibe a las neuronas vecinas). Los ganglios basales probablemente están implicados en el procesamiento de la información relacionada con la planificación de movimientos autoiniciados y en la corrección de la postura que esto involucra más que en la generación del movimiento mismo.

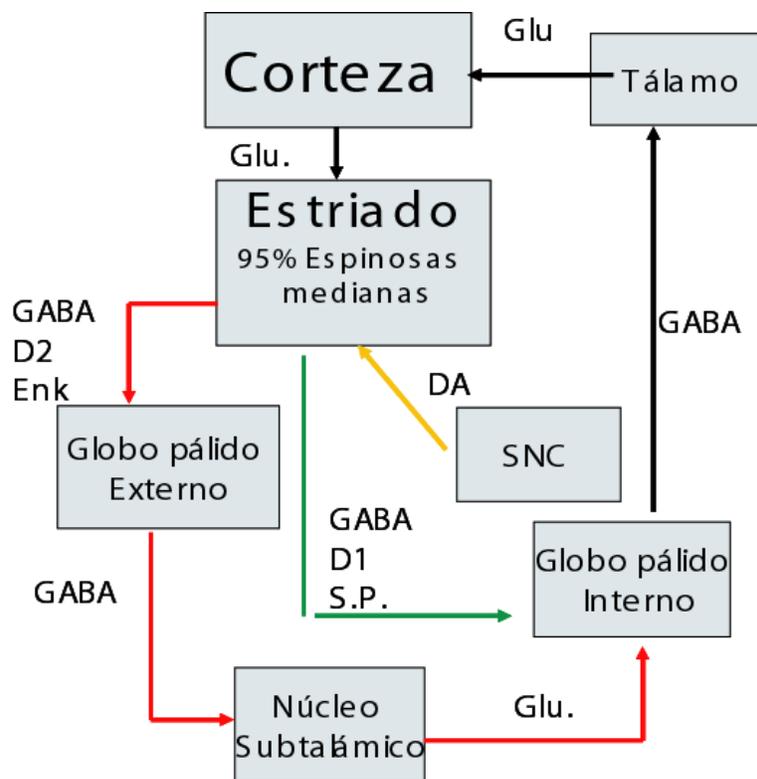


Figura 1.-Esquema que representa el procesamiento de la información en los ganglios basales. (Verde.- Procesamiento de la información en la vía directa Rojo.- Procesamiento de la información en la vía indirecta, Amarillo, inervación dopaminérgica al estriado)

## **Núcleo estriado.**

Como se mencionó con anterioridad el estriado es el núcleo de entrada de información a los ganglios basales, este recibe proyecciones provenientes de las capas supra e infragranulares de la corteza (Gerfen, 1984; Oka, 1980). Se ha reportado que diferentes regiones de la corteza proyectan a áreas topográficamente restringidas del estriado, lo cual ha permitido una división artificial del estriado dependiendo de las regiones de la corteza y el tipo de información de las que recibe aferencias. Así, el estriado se ha podido dividir en estriado sensoriomotor, asociativo y límbico (Parent., 1990).

El estriado sensoriomotor está integrado por la región dorso lateral del caudado y del putamen; recibe fibras de la corteza motora primaria, corteza premotora, corteza motora suplementaria y corteza somato sensorial (DeLong et al., 1981; Liles y Updyke, 1985)

El estriado asociativo está formado desde el putamen rostral hasta la comisura anterior, cuerpo, cola y cabeza del caudado; recibe información de la corteza asociativa parietal, frontal y temporal (Carpenter, 1981; Ragsdale y Graybiel, 1981).

Al estriado límbico lo constituye el núcleo accumbens, la porción profunda del tubérculo olfatorio, el caudado ventral y el putamen ventral; recibe aferencias de la amígdala, hipocampo, la corteza límbica y paralímbica (Haber et al., 1990; Alheid y Heimer, 1988).

La división del estriado por el área cortical de la cual recibe aferencias puede dar sustento a la hipótesis del procesamiento paralelo de la información en los ganglios basales. Sin embargo, a pesar de que diferentes regiones del estriado reciben información de áreas restringidas de la corteza, esto no implica que no exista convergencia de la información dentro del estriado. De hecho, se conoce que el número de neuronas corticales que proyectan al estriado es mucho mayor que el número de neuronas estriatales que reciben aferencias corticales, y se sabe que una sola neurona cortical puede hacer contacto con varias neuronas estriatales, mientras que una neurona estriatal recibe aferencias de varias neuronas corticales de diferentes regiones.

Las proyecciones provenientes de la corteza al estriado están organizadas en forma de racimos, esta forma de organización da lugar a dos estructuras dentro del estriado; los estriosomas o parches y la matriz extra estriosomal (Berendse et al., 1992; Parent y Hazrati, 1995). Existen diferencias importantes entre ambas estructuras que hacen suponer que tienen funciones

distintas. Se han reportado péptidos y receptores que se expresan preferencialmente en los estriomas, como la DARPP 32, el receptor D1 o el receptor D4 entre otros (Arlotta et al., 2008; Kim et al., 2002; Rivera et al., 2002). Adicionalmente, se ha encontrado que las aferencias de ambos compartimientos son distintas. Se sabe que los estriomas reciben información de la corteza prefrontal y límbica principalmente, mientras que la matriz extraestriosomal recibe principalmente, información de la corteza somato sensorial frontal, parietal y occipital (Gerfen, 1984; Gerfen, 1990). Se ha observado que los estriomas proyectan directamente a la SN, mientras la matriz extraestriosomal proyecta a la SN y al GP interno y externo (Gerfen et al., 1990). Las proyecciones de la matriz extraestriosomal están organizadas en conjuntos de axones de diferentes áreas del estriado que tienen el nombre de matriomas. Los matriomas ayudan a la convergencia de la información proveniente de la corteza (Graybiel, 1990).

### **Tipos neuronales en el núcleo estriado**

El estriado está integrado por neuronas de proyección que llevan la información a los núcleos de salida de los ganglios basales y por interneuronas las cuales establecen los circuitos locales (Parent, 1986; Graybiel, 1986). A diferencia de otras regiones del cerebro, la proporción de neuronas de proyección comparadas con las interneuronas es muy grande en el estriado. Las neuronas de proyección estriatales en roedores son casi el 95% de la población neuronal, mientras que en los primates la relación neuronas de proyección/interneuronas es de 3:1 (Graveland y DiFiglia, 1985).

*Neuronas de proyección.- Neuronas espinosas Medianas (NEM).*

Las neuronas de proyección del estriado son las neuronas espinosas medianas (NEM), tienen un soma de tamaño medio que mide de 12 a 20µM de diámetro, del cual salen 4 o 5 dendritas principales que se ramifican ampliamente y cuentan con abundantes espinas dendríticas (de ahí el nombre de Neuronas **Espinosas**), donde ocurren los contactos sinápticos con las aferencias provenientes de la corteza (Wilson y Groves., 1980). Las NEM usan GABA como neurotransmisor principal, por lo que su activación tiene un efecto inhibitorio sobre las neuronas con quienes hacen contacto. Además de GABA las NEM pueden liberar otros mensajeros como Sustancia P, Encefalina y Dinorfina. Por la expresión diferencial de receptores y péptidos, así como por el lugar a donde envían sus proyecciones, las NEM pueden dividirse en 2 subpoblaciones. La primera de las subpoblaciones son las que conforman la vía directa de los ganglios basales, éstas envían sus

axones al globo GPI y a la SNr, expresan receptores dopaminérgicos tipo D1 y sustancia P. La segunda subpoblación de NEM son las neuronas que conforman la vía indirecta de los ganglios basales, estas neuronas tienen aferencias hacia el GPe y expresan receptores de dopamina tipo D2 y Encefalina (Gerfen, 1992, Kawaguchi, 1997).

#### Tipos de conexiones de las neuronas espinosas medianas.

Las NEM reciben sinapsis glutamatérgicas de las neuronas piramidales de la corteza, se ha observado por técnicas de microscopía e inmunolocalización que los axones de las neuronas piramidales hacen contacto con la cabeza de las espinas dendríticas distales y que el tipo de sinapsis que forman es asimétrico (Dubé et al., 1988). Las NEM también reciben conexiones dopaminérgicas de fibras provenientes de la SN pars compacta (SNc), en el cuello de las espinas dendríticas (Pickel, 1981, Dubé et al., 1988). Estas conexiones ocurren preferentemente en las espinas dendríticas, en las cuales hay una conexión cortical, por lo que existe una convergencia del sistema nigroestriatal y corticoestriatal. Se sabe que la dopamina puede modular la transmisión glutamatérgica estriatal a través de la activación de receptores D1 y D2 (Flores-Hernández et al., 2002; Bamford et al., 2004).

Además de las aferencias glutamatérgicas y dopaminérgicas, las NEM reciben influencias GABAérgicas provenientes de interneuronas estriatales y de colaterales axónicas de otras NEM. Las sinapsis GABAérgicas provenientes de las interneuronas hacen contacto con el tallo dendrítico en la parte proximal al soma, donde también llegan aferencias colinérgicas provenientes de interneuronas colinérgicas (Dubé et al., 1988).

#### *Interneuronas estriatales.*

Existen varios tipos de interneuronas en el estriado, todas ellas a diferencia de las NEM carecen de espinas dendríticas. Las interneuronas estriatales se pueden dividir en al menos dos categorías de acuerdo al neurotransmisor que liberan. La primera de ellas son las interneuronas gigantes colinérgicas que tienen un soma de entre 50 y 60  $\mu\text{M}$ , su árbol dendrítico se extiende alrededor de 750  $\mu\text{m}$  y aunque representan solo el 2% de la población neuronal estriatal, sus axones dejan numerosos botones sinápticos en todo el núcleo estriado, produciendo una alta influencia colinérgica en los circuitos estriatales (DiFiglia et al., 1976, Kawaguchi et al., 1995).

La segunda categoría de interneuronas estriatales son las interneuronas GABAérgicas, miden alrededor de 15  $\mu$ M de soma y corresponden a menos del 5% de la población neuronal estriatal. Por la expresión de algunos marcadores y sus características electrofisiológicas, las interneuronas GABAérgicas pueden dividirse en varios tipos. Las primeras interneuronas GABAérgicas son las que expresan la proteína unidora de calcio Parvalbúmina y representan el 1 % de la población neuronal, tienen axones cortos y pertenecen a las interneuronas de tipo I de la clasificación de DiFiglia. Por la alta tasa de disparo de estas interneuronas (hasta 100 HZ) también son llamadas Fast Spiking o rafagueadoras (Kawaguchi et al., 1995, Tepper y Bolam., 2004)

Otro tipo de interneuronas GABAérgicas son las que expresan somatostatina, neuropeptido Y, así como calbindina. Este tipo de interneurona corresponde al tipo III de la clasificación de DiFiglia. Por el tipo de disparo neuronal son llamadas Low Threshold o de bajo umbral de disparo (Kawaguchi et al., 1995, Tepper and Bolam., 2004). Estas neuronas también liberan óxido nítrico (NOS) el cual es un mensajero retrogrado capaz de modular la transmisión glutamatérgica estriatal.

#### Conexiones de las interneuronas estriatales

Las interneuronas GABAérgicas y Colinérgicas reciben sinapsis de aferentes corticales y se piensa que ayudan al filtrado de la información después de la activación de la corteza. Las interneuronas GABAérgicas rafagueadoras son prácticamente silentes (Tepper et al., 2010), a diferencia de las interneuronas colinérgicas y las interneuronas GABAérgicas de bajo umbral que ejercen una influencia tónica sobre las NEM (Tepper et al., 2010; Kawaguchi et al., 1995). Se piensa que las interneuronas GABAérgicas tienen una función de controlar la excitación después de la activación cortical y que este mecanismo es el que permite que puedan salir los comandos necesarios para la ejecución del movimiento.

#### **Núcleo estriado y control del movimiento**

El núcleo estriado y en especial el estriado dorsal han sido relacionados con el control del movimiento. La activación simultánea y organizada de la vía directa e indirecta permite generar movimientos coordinados, su desequilibrio produce alteraciones en la ejecución del movimiento (Albin et al., 1989, DeLong et al., 1990). Algunos neuromoduladores como la dopamina tienen un papel importante en la modulación y activación de ambas vías. La dopamina favorece el movimiento. Al liberarse en las terminales nigroestriatales, activa receptores D1 en las NEM de la vía directa, la activación de estos receptores favorece la excitación de estas neuronas al estar

acoplados a proteínas Gs. Por otra parte, cuando la dopamina es liberada en las terminales de la Vía indirecta, activa receptores tipo D2 acoplados a proteínas Gi que inhiben la excitación neuronal (Vallar y Maldolesi, 1989). El resultado final de la liberación de dopamina en el estriado es el favorecimiento en la activación de la vía directa e inhibición de la vía indirecta. Sin embargo, el papel de la dopamina en el control del movimiento es aún más complejo. Se sabe que la dopamina participa en los procesos de aprendizaje motor en el estriado al controlar los mecanismos de **plasticidad sináptica** estriatal (Calabresi et al., 1992, Lovinger et al., 2003).

## **Plasticidad sináptica a largo plazo**

Una de las características más importantes del sistema nervioso es la capacidad de cambiar a consecuencia de la experiencia. Se cree que estos cambios son la base de procesos mucho más complejos como la memoria y el aprendizaje. Desde mediados del siglo pasado se ha especulado la forma en que la experiencia y la actividad de las neuronas pueden modificar las conexiones en el sistema nervioso. En 1949 el neuropsicólogo Donald Hebb propuso en su libro "The organization of behavior" que la actividad repetitiva de una neurona presináptica A sobre una neurona postsináptica B puede generar un incremento en la eficacia de la transmisión de la información. Esta capacidad de cambiar la eficiencia en la transmisión sináptica se conoce hoy en día como plasticidad sináptica.

En 1973, Bliss y Lomo comprobaron experimentalmente la idea que Hebb había propuesto por primera vez 30 años antes. Ellos mostraron en la sinapsis de la vía perforante del giro dentado del hipocampo, que después de la estimulación repetitiva a alta frecuencia (100 Hz), se incrementa la respuesta sináptica a un estímulo determinado (Bliss y Lomo., 1973). El incremento en la transmisión sináptica pudo ser seguido durante horas y fue llamado potenciación a largo plazo o LTP (por sus siglas en inglés Long Term Potentiation).

Si bien, el incremento en la eficacia sináptica es una forma de plasticidad, existe aquella que se caracteriza por la disminución en la respuesta sináptica y se le conoce como depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés Long Term Depression).

### **Mecanismos generales de LTP**

Después de la primera descripción del LTP en el hipocampo por Bliss y Lomo, cientos de trabajos se han publicado en donde se estudian los mecanismos que subyacen a la LTP, la mayoría realizados en sinapsis excitatorias. Gracias a estos estudios realizados en diferentes regiones del sistema nervioso, como el hipocampo, se ha encontrado que, en un gran número de sinapsis excitatorias, es necesaria la activación de los receptores glutamatérgicos del tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartado) para la inducción de la LTP. Antagonistas de estos receptores como el AP5 o MK 801, evitan la inducción de la LTP pero no su mantenimiento (Davies et al., 1981, Collingridge et al., 1983, Morris., 2013). Los receptores NMDA se encuentran bloqueados por el ion magnesio en el potencial de reposo de las NEM (Mayer et al., 1984, Nowak et al., 1984), para su activación, es necesaria además de la unión a glutamato, la despolarización de la membrana postsináptica que

permite liberar el bloqueo de magnesio. Se cree que esta característica sirve como filtro de coincidencia entre la activación presináptica y la postsináptica (Morris, 2013).

Los receptores NMDA son permeables a calcio y generan corrientes catiónicas entrantes, por lo que al activarse, se incrementa la concentración de calcio intracelular. Se ha descrito que el incremento en la concentración de calcio es necesario para la plasticidad a largo plazo en la mayoría de las sinapsis. El uso de moléculas que atrapan calcio (quelantes) previene la inducción de LTP y LTD (Shibuky et al., 1992, Centonze et al., 2001). Cabe destacar que no solo a través de la activación de los receptores NMDA se incrementa la concentración de calcio intracelular. Se ha reportado que canales de calcio dependientes de voltaje (Kapur et al., 1998, Wankerl et al., 2010, Youn et al., 2013) y reservorios intracelulares de calcio como el retículo endoplasmático pueden incrementar la concentración de calcio al ser activados y juegan un papel importante en el establecimiento de la LTP (Fernandez de Sevilla et al., 2008; Yamazaki et al., 2012)

El calcio actúa como segundo mensajero y activa proteínas cinasas sensibles a calcio, algunas de ellas como la CAMKII o la PKC se han relacionado con la LTP (Lovinger et al., 1987, Huang et al., 1992, Malenka et al., 1989, Lee et al., 2000, Lee., 2006, Lisman et al., 2012). Sin embargo, otras cinasas que no son sensibles a calcio como la **PKA**, ERK, **Cdk5**, MAPK, PKG, AKT, entre otras, también participan en los mecanismos de inducción y expresión de la LTP (Lee et al., 2000, Yasuda et al., 2003, Zhuo et al., 1994, Winder et al., 1999, Lee et al., 2006). Muchas de estas cinasas son activadas por neuromoduladores que actúan a través de receptores metabotrópicos, como la dopamina, que modifican la plasticidad a largo plazo.

Se ha encontrado que muchas de las proteínas cinasas relacionadas con la LTP tienen sitios de fosforilación en receptores ionotrópicos como los receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA, receptores nicotínicos y los receptores GABAérgicos GABA-A. La fosforilación en sitios específicos de estos receptores favorece su inserción en la membrana postsináptica incrementando la respuesta sináptica (Bohem et al., 2006, Esteban et al., 2003, Nakasawa et al., 2001, Saliba et al., 2012, Russo et al., 2012 Dionisio et al., 2013). Adicionalmente, se ha descrito que la fosforilación de algunas subunidades como la GluA1 de los receptores AMPA incrementan la conductancia del canal iónico (Derkach et al., 1999, Banke et al., 2000, Rosche et al., 1996, Barria et al., 1997, Kameyama et al., 1998, Lee et al., 2006), lo que genera una mayor respuesta producida por la unión del receptor a su ligando.

Los mecanismos de plasticidad antes descritos, son principalmente a nivel postsináptico. Sin embargo, existen también cambios en la presinapsis que participan en el desarrollo del LTP. En la sinapsis de la placa neuromuscular y del hipocampo, se ha encontrado que proteínas cinasas como la sinapsina 1 (Morimoto et al., 1998, Sato et al., 2000), Munk18 (Barclay et al., 2004) o la PKC en la presinapsis (Ramakers et al., 2000), incrementan la probabilidad de liberación de neurotransmisor y la eficacia sináptica asociada al LTP al fosforilar proteínas de la maquinaria de liberación de neurotransmisor, así como canales de calcio dependientes de voltaje.

### **Mecanismos generales de LTD**

La LTD es el decremento de la respuesta sináptica a un estímulo, este permanece en una ventana de tiempo que va más allá de los 30 minutos y puede persistir hasta horas, días o incluso más. Al igual que en la LTP, se ha encontrado que en algunos mecanismos que subyacen a la LTD, existe un incremento en la concentración de calcio intracelular que activa vías de señalización que finalmente inducen la expresión de la LTD (Konnerth et al., 1992; Reyes y Stanton., 1996; Ismailov et al., 2004). A diferencia de la LTP, en la LTD, el incremento en la concentración de calcio intracelular es menor (Ismailov et al., 2004). Después del incremento en la concentración de calcio se activan proteínas fosfatasa sensibles a calcio como la PP2B (Mulkey et al., 1994; Kameyama et al., 1998). Se ha encontrado que la afinidad de las fosfatasas por el calcio es mayor que la exhibida por las proteínas cinasas (Grey y Burrel, 2010), y como consecuencia, los incrementos moderados en la concentración de calcio intracelular favorecen la activación de las fosfatasas sobre las cinasas (Grey y Burrel, 2010).

Algunas proteínas fosfatasa relacionadas con la LTD como la PP2B o PP1 defosforilan receptores ionotrópicos favoreciendo su endocitosis o decrementando su conductancia, lo cual disminuye la respuesta postsináptica (Kourrich et al., 2008 Grey y Burrel., 2010).

En los mecanismos presinápticos relacionados con la LTD existe una disminución en la probabilidad de liberación de neurotransmisor (Bolshakov y Siegelbaum., 1994, Lovinger., 2008). La defosforilación de canales de calcio dependientes de voltaje asociados a la liberación de neurotransmisor como los canales N, P/Q o L, disminuye la probabilidad de apertura del canal, produciendo una entrada menor de calcio en la terminal sináptica y la cual disminuye la liberación del neurotransmisor (Connor et al., 1999; Lovinger., 2008). Por otra parte, cambios en el estado de fosforilación de proteínas asociadas a la maquinaria de liberación pueden también disminuir la

probabilidad de liberación del neurotransmisor e inducir LTD (Gage et al., 1997; Stanton et al., 2003; Lovinger, 2008).

En una misma sinapsis se puede inducir LTP o LTD de forma experimental. Se han desarrollado diferentes protocolos para inducir ambos tipos de plasticidad. De manera general los protocolos enfocados al desarrollo del LTP se basan en dar estimulación de alta frecuencia (arriba de 50 Hz) para producir la despolarización prolongada en la postsinapsis, que facilita la activación de receptores NMDA, canales de calcio dependientes de voltaje y una entrada masiva de calcio. Por otra parte los protocolos utilizados para inducir LTD generalmente se basan en estimulación de baja frecuencia (1-10 HZ), quienes producen un incremento moderado en la concentración de calcio intracelular. Sin embargo, se ha observado que no en todas las sinapsis los protocolos de alta frecuencia inducen LTP o los de baja frecuencia LTD (Calabresi et al., 1992), por lo que para cada tipo de sinapsis se han desarrollado protocolos específicos con el fin de generar ambos tipos de plasticidad.

#### **Plasticidad sináptica a largo plazo en el núcleo estriado.**

El núcleo estriado es una de las regiones del SNC donde se han estudiado los procesos de plasticidad a largo plazo debido a que participa en la memoria motora y en la generación de patrones motores aprendidos. Desde principios de la década de los 90, Calabresi y colaboradores reportaron que después de una estimulación de alta frecuencia en las terminales corticoestriatales es posible inducir plasticidad a largo plazo, siendo la LTD el tipo de plasticidad más común. (Calabresi et al., 1992).

#### **LTD corticoestriatal**

La LTD en las sinapsis corticoestriatales ha sido estudiada arduamente desde su primera descripción en los 90's. Se sabe que este tipo de plasticidad no depende de la activación de receptores NMDA ya que la aplicación de antagonistas como el AP5 no afecta su inducción (Calabresi et al., 1992). Sin embargo se ha encontrado que la LTD estriatal depende de la activación de canales de calcio tipo L (Wang et al., 2006). Así mismo, la dopamina y la activación de receptores dopaminérgicos juegan un papel importante en la expresión de la LTD (Calabresi et al., 1992, Reynolds et al., 2001, Centonze et al., 2001). Ratones en los que se ha eliminado el contenido de dopamina a través de la administración de 6-hidroxidopamina en la sustancia nigra no generan

LTD. Adicionalmente, el uso de antagonistas selectivos de los receptores dopaminérgicos del tipo D1 ó D2 impide su inducción y mantenimiento (Centonze et al., 2001).

Hasta la fecha no se sabe exactamente como los dos tipos de receptores de dopamina interactúan en la inducción de la LTD estriatal, ya que ambos receptores activan vías de señalización diferentes y parecen estar expresados en diferentes poblaciones de NEM. Sin embargo, se cree que la activación de los receptores D1 puede tener un efecto cooperativo en la activación de receptores tipo D2 (Centonze et al., 2001).

Se ha mostrado que la activación de los receptores tipo D2 con agonistas selectivos en rebanadas de cerebro en donde se eliminó el contenido de dopamina con 6OHDA, rescatan la inducción de LTD (Centonze et al., 2001). La importancia de los receptores D2 en la inducción de la LTD y la segregación en su patrón de expresión en las NEM del estriado, ha generado especulaciones en cuanto a si todas las NEM generan LTD, o si solamente las neuronas que expresan los receptores D2 de la vía indirecta pueden generar este tipo de plasticidad.

Para saber si solo una población de NEM expresa LTD se han realizado diferentes trabajos en los cuales se han registrado NEM que expresan la proteína fluorescente verde en las neuronas positivas al receptor D2 o D1. Los resultados obtenidos de este tipo de trabajos han sido contradictorios, ya que existe un reporte que muestran que solo las neuronas positivas al receptor D2 generan LTD (Single et al., 2007). Sin embargo, otro reporte, usando la misma técnica, muestra que tanto las neuronas que expresan receptor D2 como las que expresan el receptor tipo D1 generan LTD (Wang et al., 2006). Este último reporte muestra además que la activación del receptor D2 no ocurre en las NEM, si no en la interneurona colinérgica que proyecta sobre ambas poblaciones de NEM (Wang et al., 2006).

La activación en la interneurona colinérgica del receptor D2 produce una inhibición en su frecuencia de disparo. A consecuencia de esta inhibición, existe una pausa en la liberación tónica de acetilcolina (Wang et al., 2006). La acetilcolina activa receptores muscarínicos en las NEM los cuales inhiben tónicamente al canal de calcio tipo L. Como consecuencia de la inhibición de la interneurona colinérgica por la activación del receptor D2 se activa el canal de calcio tipo L en la NEM, el cual se ha relacionado con la inducción de LTD en el estriado (Wang et al., 2006).

El incremento en la concentración de calcio intracelular producido por la activación de los canales de calcio tipo L, puede activar múltiples vías de señalización, se ha encontrado que una de las vías

de señalización activadas por el incremento en la concentración de calcio es la de la producción de endocannabinoides, los cuales son liberados retrógradamente a la presinapsis, donde activan a los receptores CB1 de terminales corticoestriatales. La activación de los receptores CB1 produce una disminución en la probabilidad de liberación de neurotransmisor, asociada al LTD (Lovinger, 2010)

### **LTP corticoestriatal**

Si bien el LTD fue el primer tipo de plasticidad reportado en el estriado con protocolos convencionales, también se ha podido evocar LTP en las sinapsis corticoestriatales. Para inducir LTP, inicialmente se utilizaron protocolos de estimulación de alta frecuencia en presencia de soluciones libres de magnesio para eliminar el bloqueo de los receptores NMDA (Calabresi et al., 1992b). Posteriormente, se han realizado registros de parche perforado y protocolos que se basan en la coincidencia de la espiga sináptica (spike timing dependent plasticity) para poder inducir LTP (Partidge et al., 2000, Shen et al., 2008, Fino y Venance., 2010).

Al igual que en la LTD, la dopamina es indispensable para la inducción de LTP. Registros electrofisiológicos realizado en animales tratados con 6-hidroxidopamina muestran deficiencias en la inducción de la LTP (Centonze et al., 2001). Adicionalmente, se ha reportado que el uso de antagonistas de receptores D1 como el SCH23390 impide la expresión de la LTP en terminales corticoestriatales (Centonze et al., 2001, Reynolds y wickens., 2001, Shen et al., 2008, Lovinger., 2010).

Los receptores D1 se encuentran acoplados a proteínas Gs, al activarse producen un incremento en la concentración de AMPc por activación de la adenilato ciclasa. El incremento en la concentración de AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA). La PKA fosforila diversos sustratos celulares, uno de ellos son los receptores NMDA que incrementan su conductancia al ser fosforilados. La PKA también fosforila a la proteína fosfatasa dependiente de dopamina y AMPc de 32 kilodaltones de peso (DARPP-32). Se ha reportado que la DARPP-32 juega un papel crucial en la LTP en el estriado ya que ratones que carecen de esta proteína no generan LTP (Calabresi et al., 2000; Centonze et al., 2001).

La dopamina y sus vías de señalización son muy importantes en la expresión de la plasticidad estriatal y a pesar del avance que se tiene acerca de los mecanismos que subyacen a la LTP y a la LTD estriatal, poco se sabe de cómo se regula la expresión bidireccional de la plasticidad o porque se favorece principalmente la expresión de la LTD en el estriado a diferencia de otras regiones del

cerebro. Es probable que algunas proteínas que modulan la señalización dopaminérgica regulen la plasticidad, una de estas proteínas que regulan la señalización dopaminérgica y que pudiera regular la plasticidad en el estriado es la Cdk5.

### **Cinasa dependiente de Ciclinas 5 (Cdk5)**

La Cdk5 es una proteína cinasa descubierta a principio de la década de los 90's, miembro de la familia de las cinasas dependientes de ciclinas. Estructuralmente comparte hasta un 60% de homología en la secuencia de aminoácidos con los demás miembros de la familia (Lew et al., 1992, Meyerson et al., 1992). Sin embargo, a diferencia de los demás miembros, la Cdk5 no tiene una función durante el ciclo celular (Van Den Heuvel et al., 1993, Dhavan y Tsai et al., 2001). La Cdk5 fosforila residuos serina/treonina los cuales se encuentran inmediatamente después de una prolina. La secuencia de aminoácidos que reconoce la Cdk5 para fosforilar una proteína es X-(S/T)-P-X-(H/K/R) Siendo X = un aminoácido cualquiera, S = serina, T = Treonina, P = Prolina, (H/K/R) = aminoácidos Básicos (Beaudette et al., 1993). Al igual que los demás miembros de la familia de cinasas dependientes de ciclinas, la Cdk5 no tiene actividad de cinasa por sí misma y depende de su unión con proteínas activadoras, p35 y p39, para poder generar un complejo activo (Dhavan et al., 2000, Ishiguro et al., 1994, Lew et al., 1994, Tsai et al., 1994).

La Cdk5 se encuentra expresada ubicuamente en el organismo. Sin embargo, su actividad se encuentra centralizada en el SNC debido a la expresión localizada de sus activadores (Tsai et al., 1994, Humert et al., 2000, Humbert et al., 2000b). Se han descrito hasta el momento al menos 50 sustratos de la Cdk5, por lo cual está relacionada con diversas funciones celulares como la migración neuronal (Gilmore et al., 1998), laminación de la corteza (Chae et al., 1997), liberación de neurotransmisor (Chergui et al., 2004; Kim y Ryan et al., 2010; Son y Chung et al., 2010), inserción de receptores ionotrópicos (Morabritto et al., 2004; Biancheta et al., 2011), modulación de corrientes iónicas (Chergui et al., 2004) , adicciones (Benavides y Bibb, 2004; Benavides et al., 2007; Seiwel et al., 2007), plasticidad sináptica (Angelo et al., 2006; Lai e Ip, 2009; Hawasli et al., 2009) y memoria (Lai et al., 2012; Platner et al., 2014), entre otras funciones. Celularmente, la Cdk5 se encuentra expresada en el citoplasma, mientras sus activadores, p35 y p39, se encuentran principalmente expresados en la membrana plasmática (Dhavan y Tsai, 2001). Se ha reportado que al unirse Cdk5 con p35 o p39, estos se desprenden de la membrana citoplasmática, permitiendo fosforilar proteínas citoplasmáticas e incluso se ha reportado que estos complejos pueden translocarse al núcleo (Zhang et al., 2008).

La Cdk5 es esencial durante el desarrollo. Los ratones modificados genéticamente que no expresan Cdk5 no llegan a término o mueren en los primeros días postnatales (Ohshima et al., 1996). Algunas de las alteraciones que se han encontrado al estudiar estos animales son laminación

invertida de la corteza, anomalías en el crecimiento axónico, así como alteraciones en la liberación de neurotransmisores (Ohshima et al., 1996). Interesantemente, los animales que no expresan p35 o p39 si son viables, aunque muestran alteraciones significativas en el desarrollo del sistema nervioso (Chae et al., 1996) mientras que ratones dobles KO para p35 y p39 no llegan a término o mueren en los primeros días postnatales (Chae et al., 1997; Ko et al., 2001).

Se conoce que además de p35 y p39, existen otras dos proteínas activadoras de Cdk5: p25 y p29, que son el producto del corte proteolítico de p35 y p39 por la calpaína (Lee et al., 2000). p25 y p29 se unen con mayor afinidad a la Cdk5 que p35 y p39. Los complejos Cdk5/p25 y Cdk5/p29 tienen una mayor actividad enzimática que los complejos Cdk5/p35 y Cdk5/p39 ya que tienen un tiempo de vida media mayor (Patrick et al., 1999). Por otra parte, se ha relacionado la formación de p25 y p29 con procesos neurodegenerativos como los ocurridos en la enfermedad de Alzheimer, donde se ha encontrado una actividad exacerbada de la Cdk5 sobre la proteína Tau (Patrick et al., 1999, Town et al., 2002, Noble et al., 2003).

La actividad de la Cdk5 se modula por factores extra e intra celulares, por ejemplo; los receptores como el de integrinas y receptores TRK de neurotrofinas, regulan la actividad de la Cdk5 a través del incremento en la expresión de p35 mediante la activación de ERG1 (Li et al., 2000, Harada et al., 2001, Tokuka et al., 2000). Así mismo, la Cdk5 autorregula su actividad fosforilando a P35 y promoviendo su degradación (Patrick et al., 1998). Por otra parte, la fosforilación del residuo tirosina 15 de Cdk5 por c-ABL incrementa su actividad (Zukerberg et al., 2000), mientras la fosforilación del residuo treonina 14 la inhibe (Matsura et al., 1996).

Por otro lado, la Cdk5 tiene un papel importante sobre la sinapsis, controla su actividad, su formación, mantenimiento y función. Se ha reportado que en diferentes sinapsis como las corticoestriatales, hipocampales y corticocorticales, la Cdk5 se encuentra expresada tanto en neuronas postsinápticas, como presinápticas (Cheung e Ip., 2007), en donde regula la liberación de neurotransmisor, la conductancia de canales iónicos, la inserción de receptores ionotrópicos y las cascadas de señalización.

### **Cdk5 y liberación de neurotransmisor (modulación en la presinápsis).**

La Cdk5 modula positivamente la liberación de neurotransmisores. Se ha reportado que la inhibición de la Cdk5 por inhibidores específicos, como Roscovitine, incrementa la liberación de neurotransmisor en las colaterales de Shafer en el hipocampo. Este efecto es debido a que la Cdk5 fosforila los canales de calcio P/Q. La fosforilación de los canales P/Q por Cdk5 inhibe su interacción con la sinaptotagmina y la SNAP 25, al inhibir la actividad de la Cdk5 se favorece la interacción de los canales P/Q con la SNAP 25 y sinaptotagmina, lo que incrementa la probabilidad de liberación de neurotransmisor (Tomizawa et al., 2007). Por otra parte, se ha reportado que la Cdk5 fosforila los canales de calcio tipo N en el residuo serina 2013 del extremo carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha 1$  (Su et al., 2012), como consecuencia de la fosforilación de la subunidad  $\alpha 1$ , se incrementa la conductancia macroscópica del canal debido a un incremento en su probabilidad de apertura (Su et al., 2012), lo que incrementa la probabilidad de liberación de neurotransmisor.

Algunas proteínas de la maquinaria de liberación de neurotransmisor como Munc 18, Sinapsina 1, Amphiphysina, sinaptojanina y dimanina 1 son blanco de Cdk5 (Matsubara et al., 1996; Floyd et al., 2001; Lee et al., 2004; Tan et al., 2003; Tomizawa et al., 2003). Munc 18 es una proteína que regula negativamente la liberación de neurotransmisor a través de su asociación con la syntaxina 1 (Pevsner et al., 1994; Hata y Sudhof 1995). Se ha encontrado que la inhibición de la fosforilación de Munc 18 en el residuo treonina 574 fosforilado por Cdk5, decreta la liberación de norepinefrina (Fletcher et al., 1999). Adicionalmente, la Cdk5 controla la conductancia del poro de fusión, en parte a través de la fosforilación de Munc 18, y se ha observado que en ratones dominantes negativos de Cdk5, se incrementa el tamaño cuántico del neurotransmisor liberado, mientras que en ratones donde se sobre expresa la Cdk5 se favorece la liberación por kiss and run (Barclay et al., 2004) que es una forma de liberación de neurotransmisor rápida en donde las vesículas que contienen el neurotransmisor no se fusionan por completo con la membrana citoplasmática.

La Cdk5 modula el reciclamiento de las vesículas que contienen al neurotransmisor al fosforilar Sinaptojanina 1, dinamina 1 y amphiphysina (Matsubara et al., 1996; Floyd et al., 2001; Lee et al., 2004; Tan et al., 2003). La inhibición de la fosforilación de estas proteínas incrementa la liberación de glutamato en sinaptosomas y en rebanadas de cerebro (Kim y ryan, 2010; Tsu y tsai, 2011).

### **Cdk5 y modulación de receptores NMDA (modulación en la postsinápsis)**

A nivel postsináptico la Cdk5 se encuentra altamente expresada y puede modular la respuesta sináptica a través de la fosforilación de receptores ionotrópicos. En sinapsis glutamatérgicas se ha encontrado que la Cdk5 fosforila la subunidad NR2A del receptor NMDA, la cual es una subunidad regulatoria del receptor y que se ha asociado a la expresión del receptor en la parte central de la sinapsis, en el residuo serina 1232. Como consecuencia de la fosforilación de este residuo, se incrementa la conductancia del receptor (Li et al., 2001). Se ha reportado que la inhibición farmacológica de la Cdk5 previene la generación de la LTP mediada por receptores NMDA al inhibir la fosforilación de la subunidad NR2A (Li et al 2001).

La Cdk5 regula la inserción de receptores NMDA y AMPA. Se sabe que la Cdk5 fosforila los residuos treonina 19 y serina 25 del extremo amino terminal de la PSD 95 (Morabito 2004), la cual se une a la subunidad NR2B del receptor NMDA y facilita su agrupamiento en la densidad postsináptica. La fosforilación de PSD 95 por Cdk5 disminuye la multimerización de PSD 95 y NR2B en la membrana postsináptica de neuronas hipocámpales (Morabito et al., 2004), y se ha encontrado que la inhibición de la actividad de la Cdk5 incrementa la expresión de la subunidad NR2B de los receptores NMDA (Hawasli et al., 2007). Adicionalmente, la Cdk5 controla la endocitosis y degradación de receptores NMDA a través de la interacción Cdk5/Src (Zhang et al., 2008) facilitando la degradación del receptor por la Calpaína al formar un complejo p35/Cdk5/NR2B/Calpaína (Hawasli et al., 2007).

### **Cdk5 y señalización dopaminérgica.**

La dopamina es un modulador de la transmisión sináptica del SNC. Existen dos familias de receptores de dopamina, la familia de los receptores tipo D1 que incluyen al receptor D1 y D5 y la familia de receptores tipo de D2 que incluye a los receptores D2, D3, y D4. Ambas familias están acopladas a proteínas G. Los receptores de la familia D1 se encuentran acoplados a proteínas Gs que modulan positivamente a la adenilato ciclasa incrementando la concentración de AMPc, a consecuencia de este incremento la PKA es activada. La PKA fosforila a la DARPP 32 en el residuo treonina 34, la cual inhibe la actividad de la proteína fosfatasa 1 (PP1). Como resultado de la activación de receptores tipo D1, se incrementa la fosforilación de proteínas debido a la activación de PKA y la inhibición de PP1. La Cdk5 participa modulando negativamente la vía de señalización de los receptores D1 al fosforilar a la DARPP 32 en el residuo treonina 75. La fosforilación de este

residuo la convierte en un inhibidor de la PKA y produce un incremento en la actividad de la PP1. Se ha encontrado que la inhibición de la Cdk5 produce un incremento en la fosforilación de blancos celulares de PKA como el residuo serina 897 de la subunidad NR1 del receptor NMDA (Chergui., et al 2004)

Por otra parte, la familia D2 se encuentra acoplada a proteínas Gi y Golf que inhiben a la adenilato ciclasa. La activación de los receptores D2 inhibe a la PKA, se ha reportado que agonistas de receptores D2 incrementan la actividad de la Cdk5.

### **Cdk5 y plasticidad sináptica.**

La Cdk5 modula la plasticidad sináptica en regiones como el hipocampo. Uno de los primeros reportes en donde se demostró la participación de la Cdk5 sobre la plasticidad sináptica fue el de Tomizawa y colaboradores en el 2000. En ese estudio, se reportó un incremento en la actividad de la Cdk5 y en la expresión de p35 después de un protocolo de kindling, el cual es un modelo de reorganización y plasticidad sináptica. Adicionalmente se observaron cambios en la localización subcelular de la Cdk5 durante las diferentes etapas del kindling, pasando de estar localizada principalmente en el axón de las neuronas hipocampales antes y durante las primeras etapas del protocolo, a estar localizado preferentemente en el soma neuronal en las etapas avanzadas, en donde existe una mayor actividad de la Cdk5 (Tomizawa et al., 2000).

Adicionalmente, la Cdk5 participa en la plasticidad sináptica a través de cooperar sinérgicamente con otros moduladores de la plasticidad sináptica, como con la Reelina (Beffert 2004). La Reelina es una proteína asociada a la matriz extracelular, la cual se conoce que participa en procesos de migración neuronal en la corteza, hipocampo y cerebelo (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995; Aguilo et al., 1999; Soda et al., 2003). Se ha descrito que la Reelina modula la plasticidad sináptica incrementando la LTP (Weeber et al., 2002, Roggers et al., 2011). Sin embargo, el incremento en la LTP producido por la Reelina es prevenido en ratones KO de p35 y p39, sin afectar la señalización de la Reelina, lo que indica que la Cdk5 actúa sinérgicamente con la Reelina para modular la LTP (Beffert et al., 2004).

En el hipocampo, se ha descrito que la inhibición de la Cdk5 disminuye el umbral para evocar LTP al incrementar la expresión de los receptores NMDA mediante la regulación de la inserción de ellos en la membrana, endocitosis y degradación del receptor (Hawasli et al., 2007; Zhang et al.,

2008; Hawasli et al., 2009). Sin embargo, también se ha encontrado que la sobreexpresión de p25 y p29 que sobre activan a la Cdk5 disminuyen el umbral para evocar LTP.

En el estriado, la Cdk5 pudiera tener un papel sobre la plasticidad sináptica, ya que modula la señalización de receptores D1 y D2, los cuales se sabe son necesarios para generar LTP y LTD. Adicionalmente, la Cdk5 regula la actividad de la DARPP-32 al fosforilar el residuo treonina 75 y se sabe que la DARPP-32 es esencial para el desarrollo de la plasticidad sináptica estriatal.

### **Cdk5 y enfermedades neurodegenerativas**

Varios reportes han vinculado a la Cdk5 con procesos neurodegenerativos como los que ocurren en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, **Huntington**, esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Niemann Pick. En diferentes modelos animales de estas enfermedades, se ha encontrado un incremento en la expresión de p25, así como en la actividad de la Cdk5. Se ha reportado que la actividad desregulada de la Cdk5 promueve la generación de estrés oxidativo, a través de comprometer el sistema antioxidante celular (Sun et al., 2008). La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por estrés oxidativo produce daño mitocondrial, el cual es un proceso común en varias enfermedades neurodegenerativas.

La desregulación en la actividad de la Cdk5 conduce a la hiperfosforilación de proteínas, algunas de ellas implicadas en enfermedades neurodegenerativas, como en el caso de la proteína Tau en la enfermedad de Alzheimer (Kobayashi et al., 1993; Pei et al., 1998) y la Huntingtina en la enfermedad de Huntington (Schilling et al., 2006; Anne et al., 2007). La hiperfosforilación de Tau favorece la formación de marañas neurofibrilares, mientras que la hiperfosforilación de la Huntingtina evita su degradación por el complejo ubiquitina-proteosoma. Así mismo, se ha encontrado que la Cdk5 favorece la autofagia en modelos de la enfermedad de Parkinson al fosforilar a la Endofilina 1 (Wong et al., 2011).

Algunos reportes han mostrado que el incremento en la actividad de la Cdk5 produce exitotoxicidad, mientras que su inhibición reduce la muerte celular en modelos animales y celulares de la enfermedad de Huntington (Paoletti et al., 2008, Park et al., 2012), por lo que se ha especulado que la Cdk5 puede ser un blanco terapéutico en el tratamiento de la enfermedad de Huntington y otras enfermedades neurodegenerativas.

## Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo hereditario caracterizado por alteraciones en el control del movimiento, distonia y déficit cognitivo. Su prevalencia es de 5-7 de cada 100 000 personas, con mayor incidencia en individuos caucásicos. La etiología de la EH obedece a la mutación del Gen IT15 ubicado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p 16.3) que codifica para una proteína de 350 KDa llamada Huntingtina. La mutación del gen IT15 consiste en la inserción de varios tripletes repetidos de CAG que producen la poliglutaminación de la Huntingtina (the Huntington's disease collaborative research group., 1993). Se sabe que en individuos sanos se encuentran hasta 34 repetidos de CAG, mientras que en individuos que presentan la EH el número de repetidos es mayor de 38 (Walker et al., 2007).

La forma de transmisión de la enfermedad de Huntington es autosómica dominante, por lo que un individuo que presenta la enfermedad tiene el 50% de probabilidades de transmitirla a su descendencia. Generalmente, los primeros síntomas de la enfermedad de Huntington aparecen entre los 35-50 años de edad (Gil et al., 2009). Sin embargo, existen casos de Huntington juvenil en los cuales los síntomas pueden aparecer desde el primer año de nacimiento. Se ha encontrado que la edad de aparición de los síntomas, el progreso y la severidad de la enfermedad están relacionados con el número de tripletes repetidos, por lo que a mayor número de tripletes, más temprano se presentará la enfermedad y su progreso y severidad serán mayores (Duyao et al., 1993)

Una de las regiones que se ve afectada principalmente en la EH es el núcleo estriado (Vonsattel et al., 1985). Se ha reportado que las neuronas de proyección gabaérgicas son la estirpe neuronal más susceptible, mientras que las interneuronas colinérgicas estriatales son preservadas (Vonsattel y DiFiglia., 1998). Otras áreas del SNC que se ven afectadas en la EH son la corteza cerebral en las capas 3,5 y 6, el hipocampo (Spargo et al 1993), el giro angular en el lóbulo parietal (McDonald et al 2002), el cerebelo (Jeste et al 1984) y el tálamo (Heinsen 1999).

Se cree que la degeneración del estriado ocasiona las alteraciones en el control del movimiento característico de la EH. Se sabe que las NEM estriatales que conforman la vía indirecta y que inhiben el movimiento, son las primeras en morir durante las primeras etapas de la EH (Gil et al., 2009). La falta de inhibición ocasionada por la pérdida de estas neuronas produce la falta de control en el movimiento y la aparición de las coreas (movimientos amplios incontrolados).

Posteriormente, conforme la enfermedad avanza, las NEM que constituyen la vía directa, que promueven el movimiento, también mueren ocasionando hipocinesia y acinesia, característica de las etapas avanzadas de la EH (Gil et al., 2009).

Aun no se conocen por completo los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la EH o porqué las NEM del núcleo estriado son especialmente susceptibles. Sin embargo, se sabe que estas son especialmente vulnerables a procesos excitotóxicos, los cuales se han descrito que ocurren en la EH (Portera-Cailliau et al., 1995). De hecho, algunos de los primeros modelos de la EH se basaban en administración intra ventricular de agonistas glutamatérgicos como el ácido Kaínico y Quinolínico que producen excitotoxicidad (Walker et al., 2007).

El estriado recibe numerosas aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza y el tálamo, haciéndolo susceptible de excitotoxicidad. Se ha reportado que en modelos transgénicos de la EH como los ratones R6/2 existe una mayor liberación de glutamato en periodos sintomáticos tempranos los cuales pueden favorecer procesos excitotóxicos seguido por un decremento de la liberación en etapas tardías de la enfermedad (Cepeda et al., 2003). Adicionalmente, se ha reportado que existe una mayor sensibilidad en los receptores NMDA de las NEM en diferentes modelos de la EH (Zeron et al., 2002, Cepeda et al., 2007). El incremento en la sensibilidad de los receptores NMDA produce una mayor entrada de calcio extracelular que activa vías de señalización como la de la Caspasa 3 asociada a apoptosis. Se ha observado que en cerebros postmortem de pacientes de Huntington, así como en modelos animales de la EH, existe una mayor expresión y actividad de la Caspasa 3, y evidencia de apoptosis en el estriado (Zeron et al., 2002).

El incremento en la concentración de calcio intracelular puede ser ocasionado no solo por el aumento en la sensibilidad y activación de los receptores NMDA. Se sabe que fallas en la actividad mitocondrial produce la liberación descontrolada de calcio hacia el citoplasma proveniente del interior de las mitocondrias la cual favorece la neurodegeneración (Krieger y Duchen., 2002). Se ha reportado, que al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas, existe una falla mitocondrial en la EH, y se sabe que el estriado es especialmente susceptible de producir estrés oxidativo y muerte neuronal a consecuencia de la falla mitocondrial (Pickrell et al., 2011). Uno de los modelos que se han utilizado para recrear la EH se basa en la administración de toxinas mitocondriales como el ácido **3 nitropropionico (3-NP)** que bloquea al complejo 2 mitocondrial. Se ha demostrado que la administración intraestriatal así como sistémica de 3-NP ocasiona de

manera similar a la EH, la muerte de las NEM del núcleo estriado (Beal et al., 1993). La muerte de la NEM por la administración de 3-NP se ha asociado a la generación de estrés oxidativo (Brouillet et al., 2005), producción de especies reactivas de oxígeno (Rosenstock et al., 2004) así como excitotoxicidad (Fu et al., 1994). Adicionalmente se ha encontrado evidencia de procesos apoptóticos y necróticos en diferentes regiones del sistema nervioso tras la administración de 3NP (Pang y Geddes 1997)

Las alteraciones en la actividad mitocondrial reportadas en la EH pueden deberse a varios factores. Entre ellos, se ha reportado que la Huntingtina mutada produce agregados proteicos en el citoplasma (DiFiglia et al., 1997). Estos agregados son cortados por diferentes proteasas como la calpaína o algunas caspasas (Wellington et al., 2000, Kim et al., 2001, Lunkes et al., 2002), los fragmentos resultantes se translocan al núcleo y a la mitocondria (Lunkes et al., 2002, Panov et al., 2002). Se ha reportado que las mitocondrias obtenidas de células que expresan la Huntingtina mutada tienen un menor potencial de membrana y mantienen una capacidad menor de manejo de calcio, así mismo, se ha encontrado un déficit en la producción de ATP debido a la disminución en la actividad de los complejos II y IV (Panov et al., 2002, Choo et al., 2002, Milakovic y Jhonson et al., 2005). En el núcleo, los fragmentos de la Huntingtina mutada reprimen la expresión de PGC-1 $\alpha$  a través de la interferencia en la expresión de CREB (Cui et al., 2006). Se ha reportado que la represión en la expresión de PGC-1 $\alpha$  produce falla mitocondrial asociada a la neurodegeneración.

En el núcleo estriado, la Huntingtina mutada no solo interfiere con la expresión de PGC-1 $\alpha$ , también se ha encontrado que la Huntingtina mutada inhibe la síntesis de BDNF (Zuccato et al., 2005). El BDNF es un factor trófico de la familia de las neurotrofinas que se han relacionado con sobrevivencia neuronal, diferenciación neuronal y plasticidad sináptica. Se sabe que en el estriado el BDNF es indispensable para la sobrevivencia de las neuronas espinosas medianas. Por lo que se ha hipotetizado, que al menos en parte, el déficit de BDNF ocasiona la muerte de las NEM del estriado (Zuccato y Cataneo., 2007).

Además del papel trófico del BDNF, se ha reportado que modula la transmisión y plasticidad sináptica en varias regiones del cerebro incluido el estriado y se han encontrado alteraciones en la transmisión y plasticidad sináptica en diferentes regiones del SNC en la EH.

### **Alteraciones plásticas en la EH.**

Adicionalmente a las alteraciones motoras propias de la EH, el deterioro cognitivo es una de las características principales de la enfermedad, por lo que se ha estudiado arduamente la presencia de alteraciones sinápticas y plásticas en diferentes regiones del cerebro que pudieran explicar el déficit cognitivo. Una de las regiones más estudiadas es el hipocampo, en la cual se ha encontrado que existe una deficiencia en la inducción y mantenimiento de la LTP en ratones que expresan la Huntingtina mutada (Hodgson et al., 1999, Udsin et al., 1999). Así mismo, se ha encontrado que existe una disminución en la expresión de la potenciación post tetánica (Hodgson et al., 1999), por lo que se cree que durante la EH existen alteraciones en la maquinaria de liberación de neurotransmisor que afecta la liberación a altas frecuencias (Udsin et al., 1999, Di Fillipo et al., 2007).

El hipocampo no es la única región del SNC que presenta alteraciones plásticas en la EH, como era de esperarse, los fenómenos de plasticidad dentro del estriado también sufren modificaciones. Se ha encontrado que la administración aguda de 3-NP en rebanadas estriatales induce LTP dependiente de PKC (Calabresi et al., 2001). Por otra parte, también se ha encontrado que los animales tratados con 3-NP tienen deficiencias en la depotenciación producida por estimulación de baja frecuencia en sinapsis que previamente produjeron LTP. Se piensa que las fallas en la depotenciación son consecuencia de alteraciones en la plasticidad sináptica de las interneuronas colinérgicas (Piconni et al., 2006, Di Fillipo et al., 2007).

Los cambios en el sistema colinérgico pueden modificar la plasticidad sináptica en el estriado. Sin embargo, alteraciones en otros sistemas de neurotransmisión como el dopaminérgico, que participa en la plasticidad corticoestriatal pueden modificar la inducción de plasticidad en el estriado. Existen reportes que muestran cambios en la concentración de dopamina extracelular en modelos genéticos y farmacológicos de la EH (Chen et al., 2013). Así mismo se ha encontrado una disminución en la expresión de receptores dopaminérgicos tipo D2 (Augood et al., 1997, Araujo et al., 2000) los cuales se sabe, que son necesarios para el desarrollo de LTD. Sin embargo, no solo existen cambios en la concentración de dopamina y la expresión de sus receptores, también se ha reportado que las proteínas que participan en la señalización dopaminérgica, y que pueden tener un papel en la plasticidad estriatal, sufren cambios en su expresión, tal es el caso de la DARPP 32, que se ha reportado que disminuye su expresión en el estriado, o la Cdk5, la cual incrementa (Van Dellen et al., 2000; Crespo biel., 2009).

Si bien es cierto que los fenómenos de plasticidad son la base celular de la memoria y el aprendizaje, la desregulación de estos fenómenos puede ocasionar el desarrollo de procesos neurodegenerativos. En el estriado, la inducción de LTP no es común, y se ha descrito que el tipo de plasticidad evocado con mayor frecuencia en condiciones normales es la LTD. La LTP registrada en modelos animales de la EH pudiera favorecer la exitotoxicidad y la muerte neuronal debido a las altas concentraciones de calcio que entran a la célula, por lo que resulta de suma importancia estudiar los mecanismos moleculares que subyacen a los cambios plásticos ocurridos en la EH y que pudiera favorecer la muerte neuronal.

**Justificación:**

La Cdk5 es una cinasa que modula la señalización dopaminérgica, la cual se conoce que es importante para el establecimiento de la plasticidad sináptica corticoestriatal. Así mismo, se sabe que la Cdk5 participa en procesos neurodegenerativos como los ocurridos en la EH, en los cuales se han descrito alteraciones en la plasticidad sináptica. Se ha sugerido que las alteraciones en la plasticidad sináptica estriatal ocurridas en la EH pudieran favorecer la muerte celular de las NEM del estriado. Debido a lo anterior, es probable que la Cdk5 participe en la modulación de la plasticidad estriatal a través de modular la señalización dopaminérgica y que los cambios en la actividad y expresión de la Cdk5 participen en la plasticidad sináptica en modelos de la EH, favoreciendo la muerte neuronal. Por lo cual, es de gran relevancia entender los mecanismos por los cuales la Cdk5 participa en la plasticidad estriatal en condiciones fisiológicas normales y como estos mecanismos se ven modificados en un modelo de la EH para poder desarrollar nuevos blancos terapéuticos enfocados a prevenir la neurodegeneración que se produce en la EH.

**Hipótesis:**

- Si la Cdk5 forma parte de la señalización dopaminérgica de las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado, es posible que esta tenga un papel en la plasticidad estriatal y que esta plasticidad se vea modificada en un modelo de la EH debido a las alteraciones en la expresión y actividad de la Cdk5

**Objetivos:**

- Determinar si la Cdk5 participa en la plasticidad corticoestriatal en condiciones fisiológicas normales.
- En caso de que la Cdk5 participe en la plasticidad sináptica corticoestriatal, describir el mecanismo celular por el cual la Cdk5 modula la plasticidad sináptica dentro del estriado en condiciones fisiológicas normales.
- Determinar si la Cdk5 participa en los cambios en la plasticidad corticoestriatal en animales tratados con 3-NP como modelo de la enfermedad de Huntington
- Determinar el mecanismo por el cual la Cdk5 modula la plasticidad corticoestriatal en el modelo de la Enfermedad de Huntington basado en la administración de 3NP.

## Metodología

### Tratamiento de animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 (Harlan, Inc, México) de 30 días de nacidos los cuales recibieron tratamiento con la toxina mitocondrial 3-NP. También se utilizaron ratones control a los cuales se les administró el vehículo. Los procedimientos de cuidado y manejo de animales se realizaron conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-00-1999), titulada “Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” y fueron aprobados por el comité local de Bioética. El 3-NP se administró intraperitonealmente a una dosis de 15 mg/kg en un volumen que no rebasara 0.5 ml. El 3-NP se administró durante 5 días, una vez por día. Después de finalizar las administraciones se les dejó dos días de descanso. El 3-NP fue disuelto en Buffer fosfatos (1 mM) y el pH se ajustó a 7.4. A los ratones control se les administró el Buffer fosfatos durante los 5 días y se les dejó descansar dos días, igual que a los ratones que recibieron las inyecciones de 3-NP, antes de realizar los experimentos electrofisiológicos y de extracción de proteínas.

### Registro Electrofisiológico

#### *Obtención de rebanadas*

Los ratones fueron anestesiados profundamente con éter y sacrificados mediante decapitación. El cerebro se extrajo del cráneo y fue sumergido durante un minuto en líquido cerebroespinal artificial (ACSF) frío (4° C), el cual contenía: Cloruro de calcio (2 mM), Cloruro de potasio (3 mM), Cloruro de magnesio (1 mM), Cloruro de sodio (125 mM), Bicarbonato de sodio (26 mM), Tiourea (0.20 mM), Glucosa (0.01 M), Ácido ascórbico (0.20 mM) pH 7.4). Los hemisferios fueron separados y se colocaron en un vibratomo marca Pelco modelo 1000 plus, donde se realizaron cortes sagitales de 400 y 300  $\mu\text{m}$  que contenían al núcleo estriado. Las rebanadas se incubaron por 1 hora en ACSF a temperatura ambiente antes de realizar los registros electrofisiológicos. La solución ACSF fue burbujeada constantemente con una mezcla de  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (95%/5%)

Para el registro de campo, se utilizaron rebanadas de 400  $\mu\text{m}$  de espesor las cuales fueron colocadas en la cámara de registro donde fueron perfundidas con ACSF gasificado constantemente con la mezcla de  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ . La velocidad de perfusión de las rebanadas y la temperatura en la cámara

de registro fue monitoreada constantemente. El flujo permaneció constante durante todo el experimento a una velocidad de 1-1.5 ml/min y una temperatura de 30°C-33°C.

Los registros electrofisiológicos se realizaron en el estriado dorsolateral ubicado con ayuda de un microscopio estereoscópico. Se colocó un electrodo de estimulación bipolar de tungsteno, acoplado a una unidad de aislamiento (DS2A, Digitimer LTD) en el cuerpo calloso, para estimular los axones de las neuronas piramidales de la corteza que inervan al estriado y se utilizó un electrodo de registro hecho de una pipeta de borosilicato situado dentro del estriado a  $\approx 500\mu\text{m}$  de distancia del electrodo de estimulación. El electrodo de registro fue llenado con una solución de NaCl al 0.09%. La señal obtenida fue amplificada con un amplificador Grass P15D y digitalizada con una tarjeta ATM10 acoplada a un sistema de análisis de señales de un programa hecho en casa en el ambiente LabView.

#### *Registro unicelular en fijación de voltaje*

Para el registro de célula completa en la modalidad de fijación de voltaje, se utilizaron rebanadas de  $300\mu\text{m}$  que contenían al núcleo estriado. Las rebanadas se pusieron en una cámara de registro continuamente perfundida con una solución Ringer que contenía en mM: 130 NaCl, 26  $\text{NaHCO}_3$ , 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3 KCl, 2.0  $\text{MgCl}_2$ , 2 CaCl<sub>2</sub> y 10 Glucosa. Se ubicó el núcleo estriado y se identificaron las NEM con la ayuda de un microscopio Olympus BX51WI de contraste de fases acoplado a una cámara CCD. Para registrar la actividad sináptica se utilizaron electrodos de borosilicato con una resistencia de 3-5 M $\Omega$  que contenían solución interna compuesta en mM por: 72  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 36 KCl, 2  $\text{MgCl}_2$  (6  $\text{H}_2\text{O}$ ), 10 HEPES sal Na, 1.1 EGTA, 0.2  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 0.2  $\text{Na}_3\text{GTP}$ . La señal obtenida fue amplificada con un amplificador Axopatch 200 B (Axon molecular devices) y digitalizada con una tarjeta digitalizadora Digidata 1322 A (Axon molecular devices) acoplado a un software de adquisición (pClamp 9.1).

La resistencia en serie fue compensada en un 80% y solo se grabaron células que tenían una resistencia de acceso por debajo de 30 M $\Omega$ . La resistencia de acceso fue monitoreada durante todo el registro, solo se aceptaron registros en donde la resistencia de acceso se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento.

La estimulación utilizada para evocar tanto una espiga poblacional como una respuesta postsináptica excitatoria unicelular osciló en un rango de 5 a 40 mV y con una duración de 100-200 microsegundos. En todos los experimento electrofisiológicos se realizaron curvas de intensidad-

amplitud con el fin de ajustar el voltaje de estimulación al voltaje que evocara la amplitud media de la respuesta poblacional. La frecuencia de estimulación que se utilizó fue de 0.1 Hz.

En todos los registros estuvo presente el antagonista de los receptores GABAA, Bicuculina (1  $\mu$ M) para aislar la transmisión glutamatérgica estriatal. Una vez que se obtenía un registro poblacional o unicelular, se monitoreaba la actividad sináptica al menos 15 minutos para verificar la estabilidad del registro y se grabó al menos 10 minutos de línea base antes de cualquier manipulación farmacológica o estimulación de alta frecuencia.

#### *Curvas intensidad-amplitud*

Para las curvas intensidad-amplitud se encontró el voltaje mínimo necesario para poder evocar una respuesta sináptica claramente definida. A este voltaje mínimo se le consideró como el umbral para generar la respuesta sináptica. Posteriormente se incrementó el voltaje de estimulación en múltiplos del umbral (1X, 1.5X, 2X, 2.5X, etc.) y se grabó cada incremento de voltaje al menos 1 minuto. Para conocer la cantidad máxima de estimulación, se continuó incrementando el voltaje de estimulación hasta que la amplitud de la espiga poblacional ya no incrementara a pesar del aumento en la estimulación. A este valor de estimulación se le consideró como el valor supra umbral de estimulación.

#### *Protocolo de estimulación a alta frecuencia.*

Para evocar la plasticidad sináptica dentro del estriado se realizó un protocolo de estimulación a alta frecuencia el cual consistía en administrar 3 trenes de estimulación a 100 HZ con un intervalo de 20 segundos entre ellos. La estimulación durante el protocolo de alta frecuencia fue supraumbral.

### **Western Blot**

#### *Obtención de proteínas*

Para el análisis de la expresión de proteínas por Western Blot se obtuvieron proteínas provenientes de tejido estriatal el cual fue disgregado mecánicamente en buffer de lisis que contenía 26 mM Tris-HCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1.3 glicerol, 130mM NaCl y Complete® (protease inhibitor cocktail). Después de homogenizar el tejido mecánicamente, se centrifugó a 4500 rpm

durante 5 minutos y se obtuvo el sobrenadante el cual contenía la fracción protéica. Las proteínas se cuantificaron por la técnica de Bradford y congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$

#### *Electroforesis y transferencia.*

Para la electroforesis se utilizaron geles de acrilamida/bis-acrilamida al 10%, lo cuales se cargaron con  $80\mu\text{g}$  de proteína en cada pozo. Para separar las proteínas por peso molecular, se realizó una electroforesis aplicando una corriente de 90V y 150A durante 1:40 hr a en una cámara de electroforesis Biorad que contenía buffer de corrida (Tris, Glicina, SDS). Al terminar la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF. Para la transferencia se utilizó la misma cámara de electroforesis que contenía buffer de transferencia (TRIS, Glicina, Metanol) frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y se aplicó una corriente eléctrica de 90 V y 150 A durante 2 horas.

Una vez que las proteínas fueron transferidas a la membrana de PVDF, esta se bloqueó con leche sin grasa al 5% en PBS durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### *Inmunodetección.*

Para la detección de las proteínas de interés se incubaron las membranas, previamente bloqueadas, al menos 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  con anticuerpos primarios específicos contra Cdk5 (Santa Cruz), pDARPP-32 treonina 75 (Millipore), pDARPP-32 treonina 34 (Millipore), Tubulina (Cell signalling),  $\beta$ -Actina (Santa cruz), p35 (Santa cruz) y Calpaína (Chemicon), los cuáles se utilizaron a una dilución de 1:1000 en PBS+leche (5%), con excepción de p35, el cual se utilizó una dilución de 1:500 en TBS + Leche. Después de la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados, de 10 minutos cada uno, con PBS + tween 20 al (0.05%). Posteriormente se incubaron las membranas con anticuerpos secundarios unidos a la enzima HRP durante 2Hr a temperatura ambiente y al finalizar la incubación se repitió el ciclo de tres lavados con PBS+Tween 20.

Para detectar las proteínas se utilizó un sistema de quimioluminiscencia y se reveló en placas radiográficas marca Kodak. Las placas fueron escaneadas y se realizó la densitometría de la señal obtenida de cada una de las proteínas con ayuda del software Image J.

## Resultados

### El inhibidor de la Cdk5 Roscovitine incrementa la inducción de la LTP en las sinapsis corticoestriatales

#### La LTD es el tipo de plasticidad sináptica más común en el estriado

Uno de los objetivos principales del proyecto, fue evaluar el papel de la Cdk5 en la plasticidad corticoestriatal en condiciones fisiológicas normales. Para ello, se realizaron registros electrofisiológicos de campo en presencia y ausencia del inhibidor de la Cdk5 Roscovitine. En ausencia de Roscovitine y después de un tren de estimulación de alta frecuencia (EAF), se evocó LTD y LTP en las sinapsis corticoestriatales. La LTD se presentó en el 62.5% de los registros mientras la LTP en el 37.5% (Fig. 1B). Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente en la literatura donde se ha reportado que la LTD es el tipo de plasticidad a largo plazo más común en las sinapsis corticoestriatales. La disminución en la amplitud de la espiga poblacional en los registros en donde se presentó el LTD fue de  $51.762 \pm 8.17\%$  con respecto al control mientras el incremento en la respuesta sináptica en los registros que mostraron LTP fue de  $31.544 \pm 4.643\%$  con respecto al control (Fig. 1C, D).

#### La inhibición de la Cdk5 modula la transmisión corticoestriatal y favorece la inducción de LTP

Para evaluar el papel de la Cdk5 en la plasticidad corticoestriatal se administró Roscovitine a una concentración de  $20 \mu\text{M}$  en el baño de perfusión. La inhibición de la Cdk5 por Roscovitine produjo un incremento de  $113.57 \pm 21.91\%$ , con respecto al control en la amplitud de la espiga poblacional (Fig. 2A-C). Al analizar la facilitación por pulso pareado, la cual es una herramienta que permite discernir cambios a nivel pre o postsináptico, se encontró una disminución en la facilitación por pulso pareado (FPP) (antes de Roscovitine=  $1.794 \pm 0.166$  vs en presencia de Roscovitine=  $1.057 \pm 0.139$ ) (Fig. 2A). Lo que sugiere la participación de mecanismos presinápticos en la modulación sináptica por la inhibición de la Cdk5. Después de aplicar la EAF para inducir plasticidad en presencia de Roscovitine, se encontró que el porcentaje de registros que presentaron LTP fue del 50% (Fig 2E). El incremento en la amplitud de la espiga poblacional en estos registros fue del  $64.864 \pm 6.598\%$  con respecto al control (Fig. 2D), mientras que en los registros donde se presentó LTD, la disminución de la respuesta sináptica fue de  $27.485 \pm 5.48\%$  con respecto al control (Fig 2D). Al analizar la facilitación por pulso pareado en estos registros, se

encontró que en los registros en donde se presentó LTD no hubo cambios significativos en la FFP (pre EAF=  $1.28162 \pm 0.23645$  vs post EAF=  $1.07476 \pm 0.11236$ ) mientras que en los registros que presentaron LTP se presentó una disminución significativa en la FFP (pre EAF=  $1.16602 \pm 0.23645$  vs post EAF=  $1.07476 \pm 0.11236$ ) (Fig.- 3E-F). Al comparar la magnitud del LTP obtenido en presencia y ausencia de roscovitine se encontró que la inhibición de la Cdk5 favorece significativamente la LTP incrementando la frecuencia de inducción y magnitud (frecuencia de LTP control= 32.5% vs Roscovitine= 50%, Magnitud de LTP control=de  $31.544 \pm 4.643\%$  vs Roscovitine=  $64.864 \pm 6.598\%$ ) (Fig. 3).

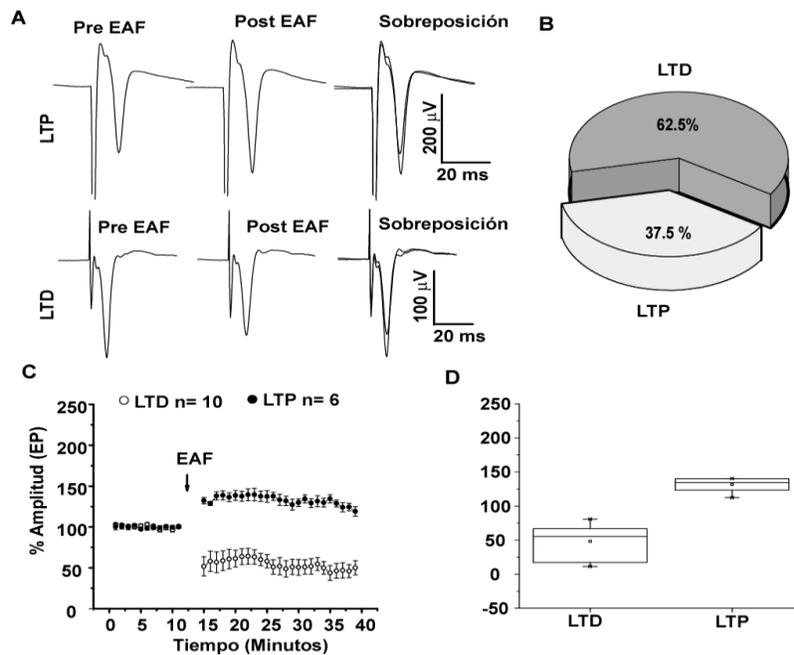


Figura 1.- Plasticidad sináptica corticoestriatal en condiciones fisiológicas. A) Trazos representativos de registros de campo antes y después de EAF. Arriba, trazo de un registro en donde se indujo LTP. Abajo, trazo de un registro en donde se indujo LTD. B) Gráfica de pastel que muestra el porcentaje de registros en los que se indujo LTD y LTP. C) Curso temporal de registros poblacionales en los que se indujo LTD y LTP. Se grafica el % de amplitud de la espiga poblacional (EP) normalizada al 100%. D) Gráfica de Boxplot que muestra los cambios en la amplitud de la EP en los registros que mostraron LTD y LTP

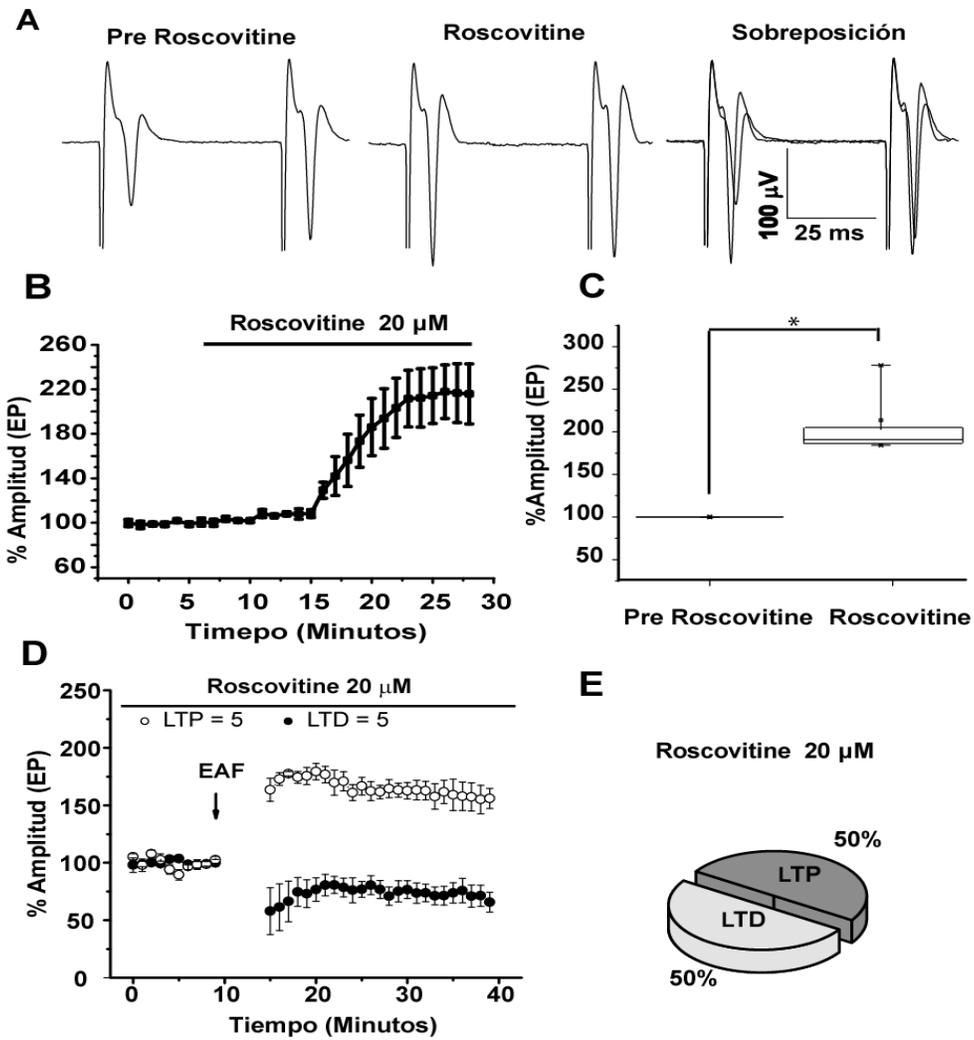


Figura 2.- La inhibición de la Cdk5 modula la transmisión sináptica corticoestriatal y la plasticidad sináptica. A) Trazos representativos de un registro de campo que muestra el incremento en la EP antes y durante la aplicación de Roscovitine. B) Curso temporal de la modulación de la EP al aplicar Roscovitine en el baño de perfusión. C) Gráfica de Boxplot que muestra el incremento en la EP al ser inhibida la Cdk5. D) Curso temporal de registros que mostraron plasticidad en condiciones en las que fue inhibida la Cdk5. E) Gráfica de pastel que muestra el % de registros poblacionales que mostraron LTD y LTP en presencia de Roscovitine

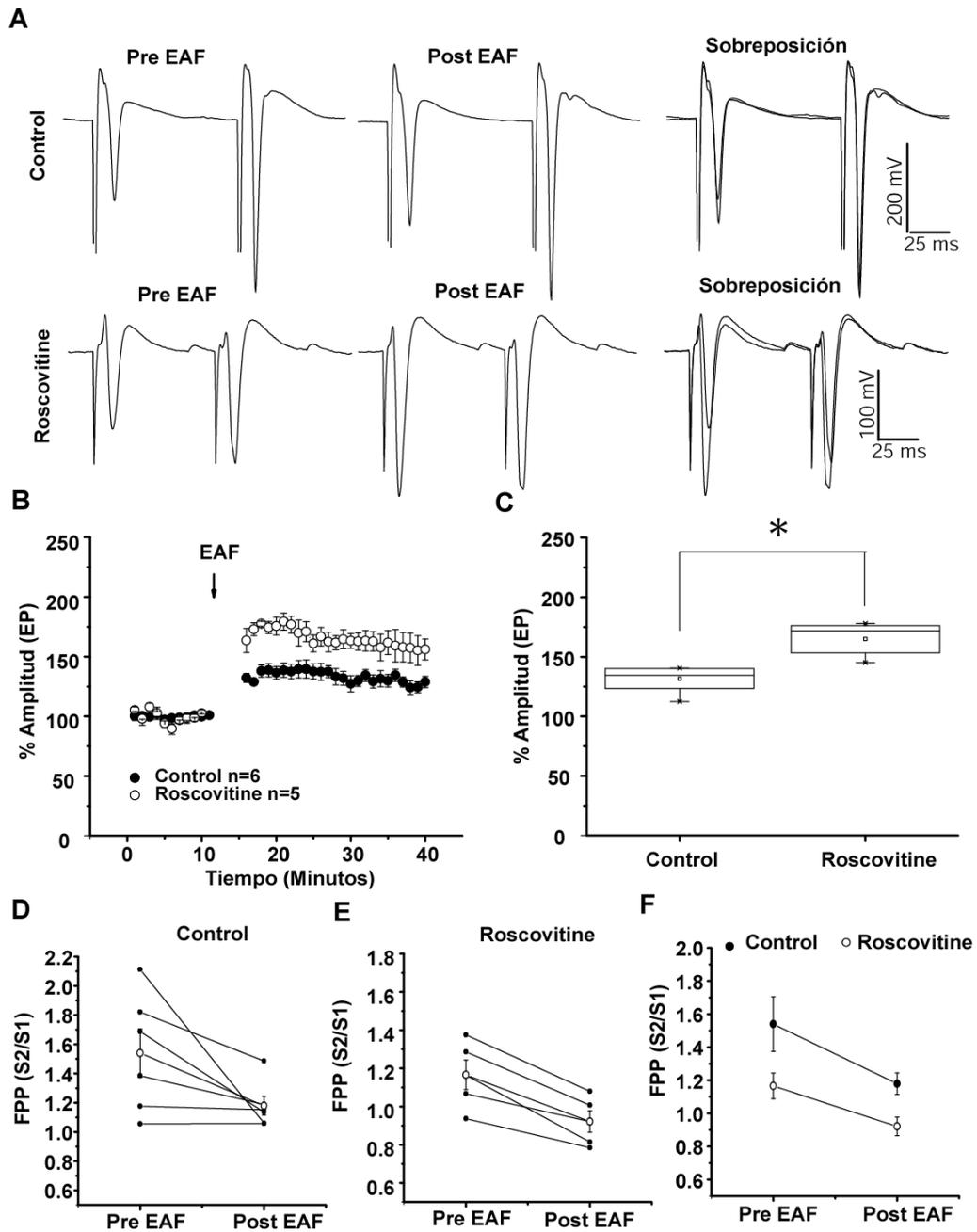


Figura 3.- La inhibición de la Cdk5 favorece la LTP. A) Trazos representativos de registros de campo en los cuales se indujo LTP en ausencia (arriba) y presencia (abajo) de Roscovitine. B) Curso temporal de registros de campo en los que se indujo LTP en presencia (círculos abiertos) y ausencia (círculos cerrados) de Roscovitine C) Gráfica de Boxplot que muestra el % de cambio en la amplitud de la EP de registros que mostraron LTP en presencia y ausencia de Roscovitine. D) Análisis de la FPP antes y después de la EAF en ausencia de Roscovitine. E) Análisis de la FPP antes y después de la EAF en presencia de Roscovitine F) Análisis de la FPP antes y después de la EAF en presencia y ausencia de Roscovitine

### **El favorecimiento de la LTP producido por la inhibición de la Cdk5 depende de la activación de receptores dopaminérgicos**

Se ha reportado que la Cdk5 participa en la vía de señalización de los receptores dopaminérgicos tipo D1, los cuales se han relacionado con la inducción de LTP. Para conocer si los receptores dopaminérgicos se encontraban involucrados en el mecanismo por el cual la Cdk5 favorece la LTP corticoestriatal, se realizaron experimentos en presencia de roscovitine y antagonistas específicos de receptores tipo D1 y tipo D2 (SCH23390 y Sulpiride respectivamente). En presencia de SCH23390 1 $\mu$ M, se previno completamente la inducción de LTP (pre EAF=101.03343 $\pm$ 0.73621 vs post EAF= 102.71519  $\pm$  5.12222) (Fig. 4 A,C,D), mientras que en los registros donde estuvo presente Roscovitine + Sulpiride 1 $\mu$ M, la magnitud del LTP fue significativamente menor que en donde solo estuvo presente roscovitine (LTP Roscovitine= 64.864  $\pm$  6.598 vs LTP Roscovitine + Sulpiride= 27.721  $\pm$  6.285) (Fig 4B-D). El análisis de la FPP no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos (FPP SCH pre EAF=0.98055 $\pm$ 0.0652 vs post EAF= 0.93332 $\pm$ 0.0814; FPP Sulpiride pre EAF= 1.0254 $\pm$ 0.04726 post EAF= 0.89143 $\pm$ 0.02324) (Fig. 4E-G)

### **La vía PKA/DARPP32 participa en el mecanismo por el cual la inhibición de la Cdk5 favorece la LTP**

Se conoce que la activación de los receptores Dopaminérgicos controla la actividad de la PKA, siendo la activación de receptores D1 promotora de la activación de la PKA, mientras que la activación de receptores D2 es inhibitoria. Una vez activada la PKA, ésta fosforila a la DARPP-32 en el residuo treonina 34, convirtiéndola en un inhibidor de la PP1. Adicionalmente, la Cdk5 fosforila a la DARPP-32 en el residuo treonina 75 convirtiéndola en un inhibidor de la PKA. Debido a lo anterior, y teniendo en cuenta que la activación de los receptores dopaminérgicos está involucrada en el favorecimiento del LTP por la inhibición de la Cdk5, se realizaron experimentos en presencia de un inhibidor de la PKA (H89) y Roscovitine para conocer si la PKA participa en el mecanismo del favorecimiento del LTP ocasionado por la inhibición de la Cdk5.

En presencia de Roscovitine + H89 (5  $\mu$ M) se previno la inducción de LTP después de una EAF (pre EAF= 100.609 $\pm$ 0.373, Post EAF= 101.427  $\pm$  4.29) (Fig. 5A-C), lo que sugiere la participación de la PKA en el favorecimiento de la LTP originado por la inhibición de la Cdk5. Como se esperaba, el valor de la facilitación por pulso pareado (FPP) no cambió en estos registros (pre EAF= 0.95871 $\pm$ 0.03682 vs post EAF= 0.88438 $\pm$ 0.05187) (Fig. 5D, E). Por otra parte, debido a que la

DARPP-32 integra la señalización dopaminérgica con la actividad de la Cdk5; se realizaron experimentos en donde se analizó el estado de fosforilación de la DARPP-32 en presencia y ausencia de roscovitine. En estos experimentos se encontró que la aplicación de Roscovitine incrementa la fosforilación del residuo treonina 34 asociado a la activación de PKA en 2.12 veces comparado con el control, mientras que disminuye la fosforilación del residuo treonina 75 en un 39% respecto al control (Fig. 6). Así mismo, se encontró que en condiciones de alto potasio (10mM), que producen una despolarización masiva similar a la generada por trenes de alta frecuencia, se incrementa la fosforilación del residuo treonina 34 de la DARPP-32. Adicionalmente, en presencia de alto potasio + roscovitine, el incremento en la fosforilación del residuo treonina 34 es aún mayor que el obtenido solo en presencia de alto potasio (Fig. 6).

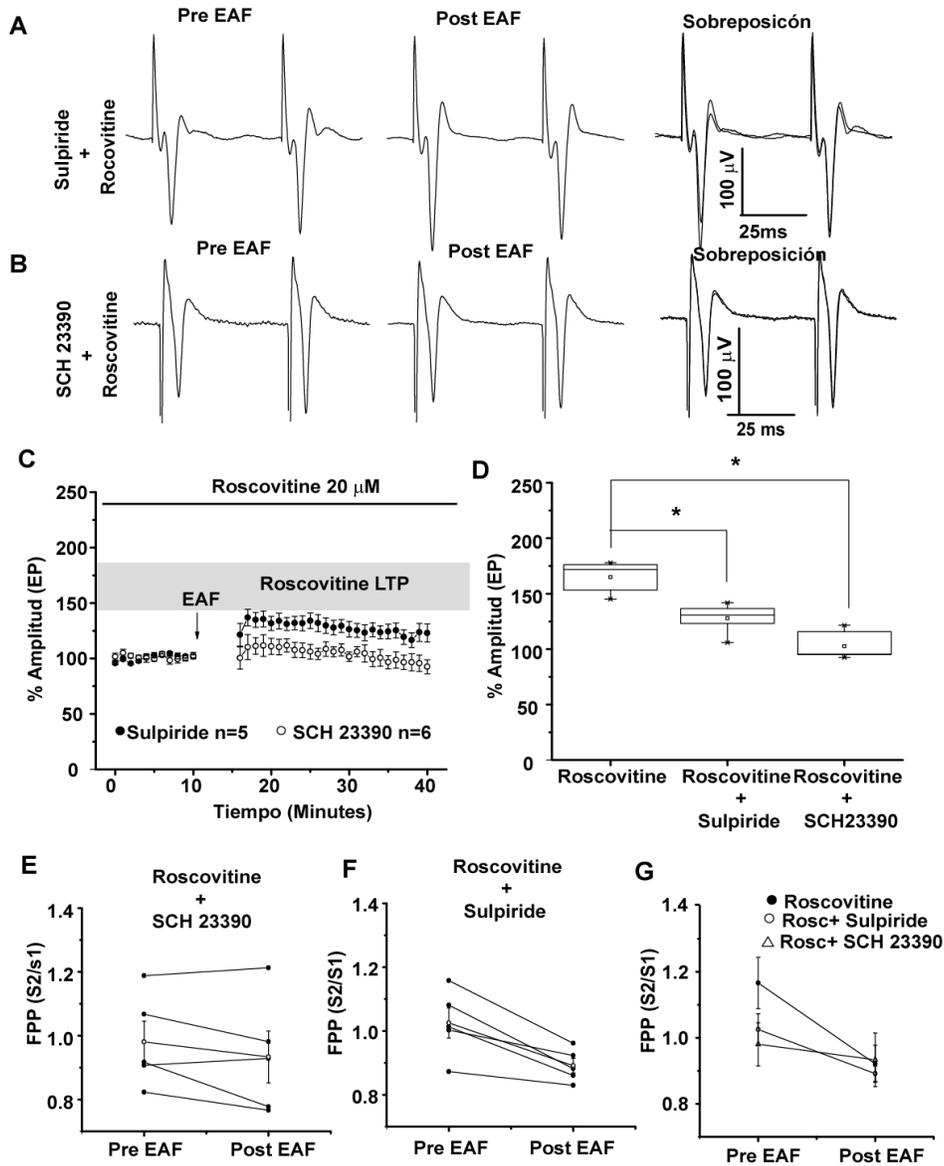


Figura 4.- El favorecimiento de la LTP por la inhibición de la Cdk5 depende de la activación de los receptores dopaminérgicos. A) Trazos representativos de registros poblacionales en presencia de Roscovitine + sulpiride. B) Trazos representativos de registros poblacionales en presencia de Roscovitine + SCH23390. C) Curso temporal de registros poblacionales en presencia de Roscovitine + sulpiride (círculos cerrados) y Roscovitine + SCH 23390 (círculos abiertos). D) Gráfica de Boxplot que muestra el cambio en la amplitud de la EP después de la EAF en presencia de Roscovitine, Roscovitine + sulpiride y Roscovitine + SCH 23390. E) Análisis de la FPP antes y después de la EAF en presencia de roscovitine + SCH 23390. F) Análisis de la FPP antes y después de la EAF en presencia de Roscovitine + sulpiride. G) Análisis de la FPP antes y después de la EAF en presencia de Roscovitine, Roscovitine + SCH 23390 y Roscovitine + sulpiride.

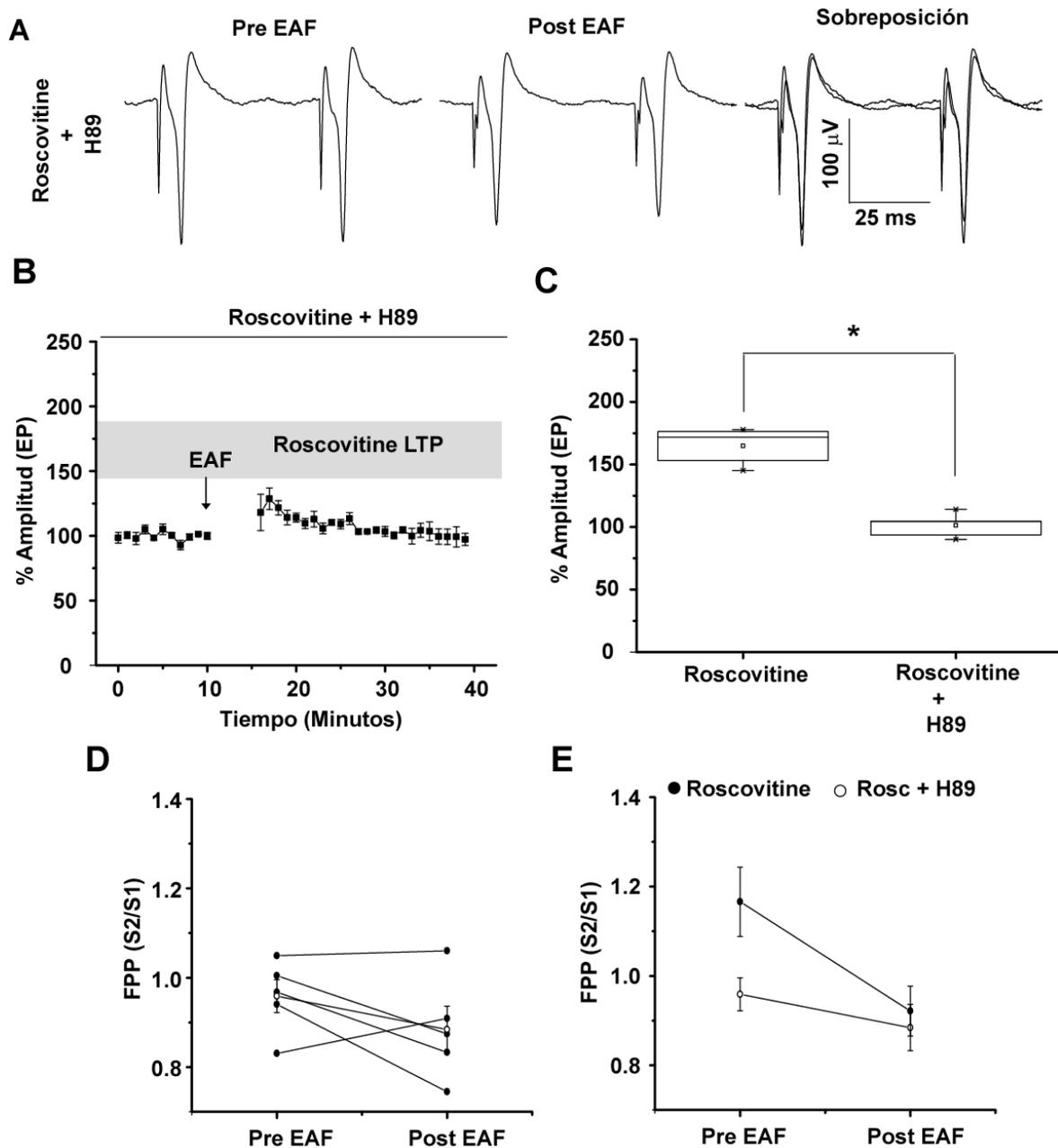


Figura 5.- El bloqueo de la PKA previene el favorecimiento de la LTP por la inhibición de la Cdk5. A) Trazo representativo de un registro poblacional en presencia de H89 + Roscovitine. B) Curso temporal de registros poblacionales en presencia de H89 + Roscovitine. C) Gráfica de boxplot que muestra el incremento en la amplitud de la EP después de la EAF en presencia de Roscovitine y H89 + Roscovitine. D) Análisis de la FPP de los experimentos individuales antes y después de la EAF en presencia de H89 + Roscovitine. E) comparación de la FPP antes y después del tren de registros poblacionales en presencia de Roscovitine y H89 + Roscovitine.

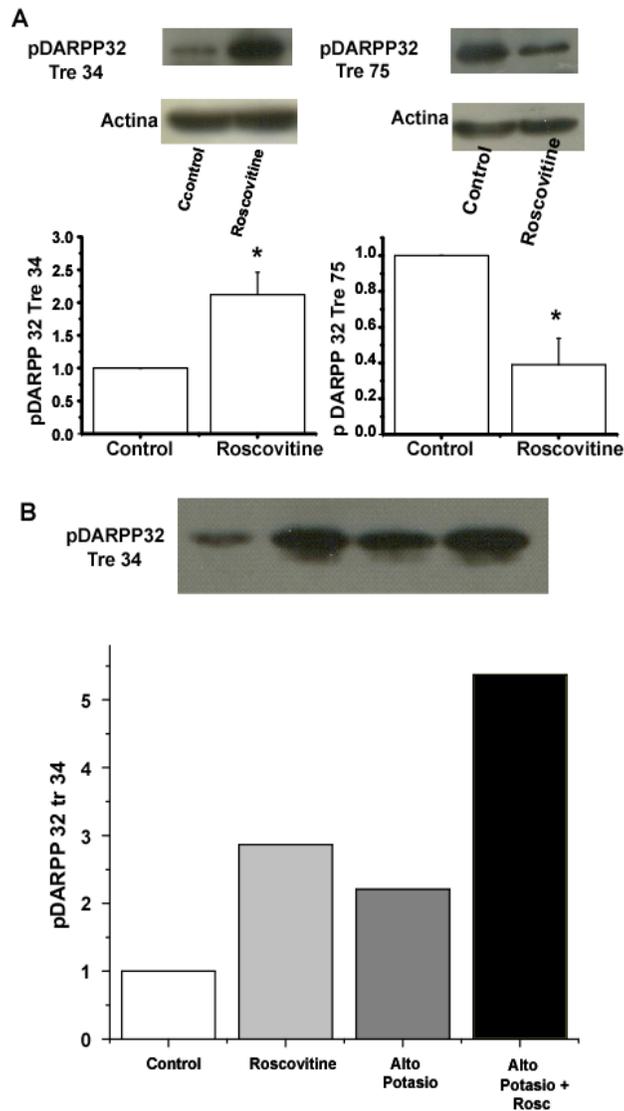


Figura 6.- Cambios en el estado de fosforilación de DARPP 32 correlacionan con el favorecimiento de la LTP por Roscovitine. A) Arriba izquierda.- imagen representativa de un WB contra pDARPP-32 tr 34 abajo izquierda.- Gráfica de barras que muestra el incremento en la fosforilación del residuo treonina 34 de DARPP 32 tras la inhibición de la Cdk5 arriba derecha.- imagen representativa de un WB contra pDARPP-32 tr 75 abajo derecha.- Gráfica de barras que muestra el decremento en la fosforilación del residuo treonina 75 de DARPP 32 tras la inhibición de la Cdk5. B) Arriba.- Imagen representativa de un WB contra pDARPP-32 en condiciones de alto potasio. Abajo.- Grafica de barras que resume el incremento en la Fosforilación de pDARPP32-tr34

## **Canales de calcio tipo L y receptores NMDA participan en el favorecimiento del LTP por la inhibición de la Cdk5**

Se sabe que el incremento en la concentración de calcio intracelular favorece la inducción de LTP, así mismo, se ha reportado que la actividad de la PKA puede producir un incremento en las concentraciones de calcio intracelular al fosforilar canales de calcio dependientes de voltaje, y receptores ionotrópicos permeables a calcio, como los receptores NMDA. Para conocer si dos de las entradas de calcio (Canales de calcio tipo L y receptores NMDA) participan en el efecto de la inhibición de la Cdk5 sobre la LTP, se realizaron experimentos en presencia del inhibidor del canal de calcio tipo L, Nifedipine (10 $\mu$ M), y el antagonista de receptores NMDA, AP5 (50 $\mu$ M), en presencia de Roscovitine. En los registros donde estuvieron presentes AP5 + Roscovitine hubo una disminución significativa del LTP comparado con los registros en donde solo estuvo presente roscovitine (LTP Roscovitine= 64.864 $\pm$ 6.598% LTP Roscovitine + AP5= 25.584 $\pm$ 3.85) (Fig.7 A,C,D), mientras que en los registros donde estuvieron presentes Nifedipine y Roscovitine, se previno completamente la inducción del LTP (Pre EAF= 99.789 $\pm$ 0.493 Post EAF= 103.322 $\pm$ 3.486) (Fig. 7B-D). Esto Muestra que el incremento en la LTP producido por la inhibición de la Cdk5, se debe parcialmente a la activación de los receptores NMDA y a la activación de los canales de calcio tipo L. El análisis de la FPP en ambas condiciones no mostró diferencias significativas (FPP AP5 pre EAF= 1.34615 $\pm$ 0.18967 vs post EAF=1.15353 $\pm$ 0.13501; FPP Nifedipine pre EAF= 1.1602 $\pm$ 0.16554 vs post EAF= 1.08686 $\pm$ 0.09735) (Fig. 7 E-G)

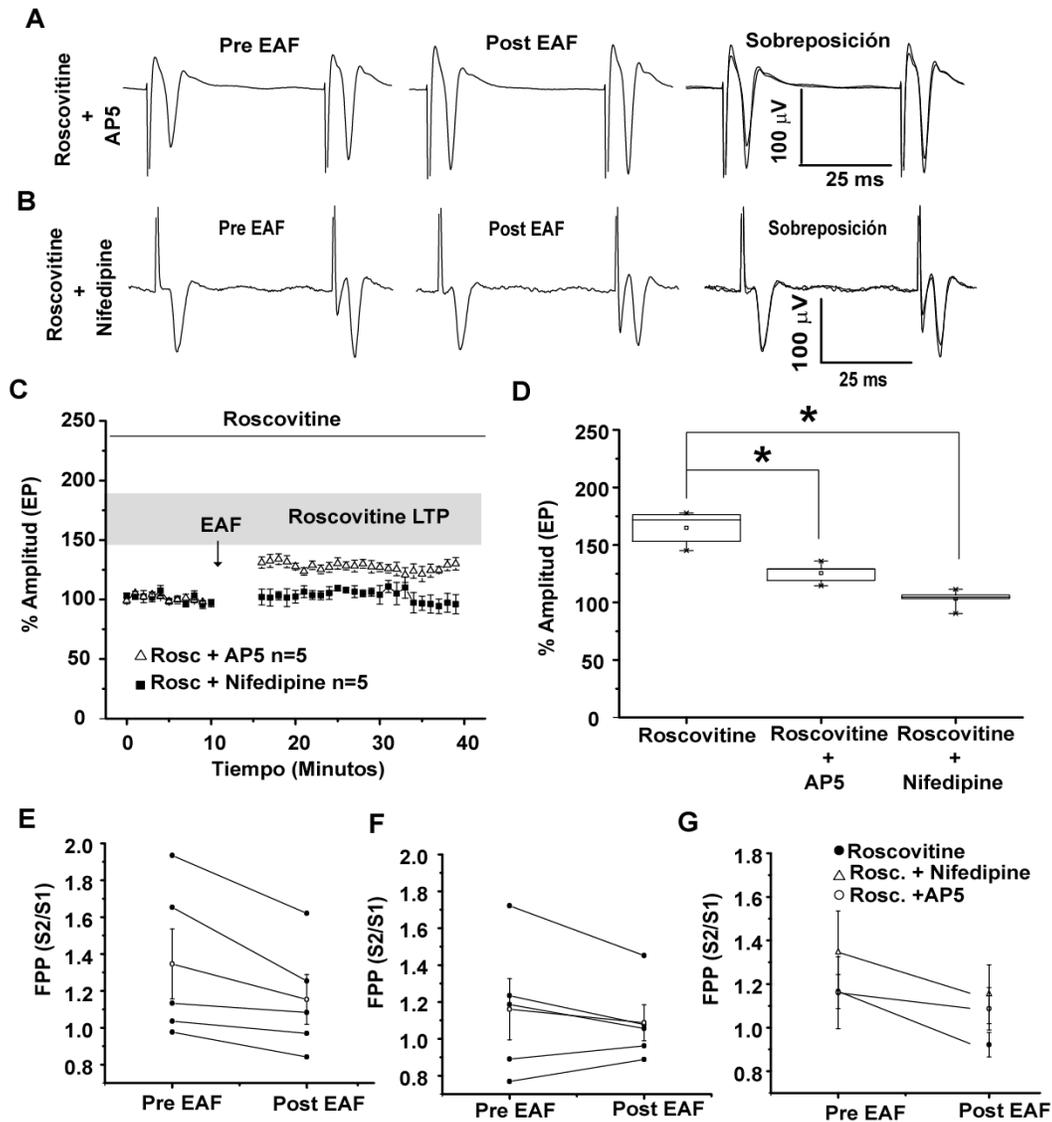


Figura 7.- Canales de calcio tipo L y receptores NMDA están involucrados en el favorecimiento del LTP por la inhibición de la Cdk5. A) Trazo representativo de un registro poblacional en presencia de el antagonista de los receptores NMDA (AP5) + roscovitine. B) Trazo representativo de un registro poblacional en presencia del bloqueador de los canales de calcio tipo L (Nifedipine) + roscovitine. C) Curso temporal de registros poblacionales en presencia de AP5 + Roscovitine (triángulos abiertos) y Nifedipine + Roscovitine (cuadrados negros) D) Gráfica de Boxplot que muestra el incremento en la amplitud de la EP después de la EAF en presencia de Roscovitine, AP5 + Roscovitine y Nifedipine + Roscovitine. E) Análisis de la FPP de registros poblacionales en presencia de AP5 + Roscovitine. F) Análisis de la FPP de registros poblacionales en presencia de Nifedipine + Roscovitine. G) Comparación de la FPP de registros poblacionales en presencia de Roscovitine, AP5 + Roscovitine y Nifedipine + Roscovitine.

## **El favorecimiento de la LTP se presenta en las dos subpoblaciones de neuronas espinosas medianas**

Mediante la técnica de campo se observó que la inhibición de la Cdk5 favorece la inducción de la LTP en sinapsis corticoestriatales. Así mismo, se encontró que el mecanismo por el cual se favorece la LTP tras la inhibición de la Cdk5 involucra la activación de receptores dopaminérgicos, la activación de la PKA, así como la participación de los canales de calcio tipo L y receptores NMDA. Sin embargo, debido a la participación de los receptores dopaminérgicos, que se encuentran expresados diferencialmente en las dos subpoblaciones de espinosas medianas, es posible que el efecto de la inhibición de la cdk5 sobre la plasticidad estriatal sea diferente en ambos tipos de espinosas medianas. Para conocer si la Cdk5 modula diferencialmente la plasticidad en las dos subpoblaciones de espinosas medianas, se realizaron experimentos de registro de célula única en ratones que expresan la proteína fluorescente verde en las neuronas espinosas medianas que expresan el receptor D1 y conforman la vía directa. En estos experimentos se encontró que en ambas poblaciones de espinosas medianas (GFP+ y GFP-) se induce LTD después de la EAF (GFP-pre EAF=101±0.29936 vs post EAF=71.23778±3.64852, GFP+ pre EAF= 100.62595±0.80927 vs post EAF= 61.78255±9.36815)(Fig. 8), adicionalmente se observó que después la inhibición de la Cdk5 por Roscovitine, en ambas poblaciones existe un cambio en el tipo de plasticidad a largo plazo cambiando de LTD a LTP (Pre EAF=99.656±0.468% Post EAF= 138.107±12.421%) (Fig 9 A,B). Debido a que en ambas poblaciones se obtuvo LTP con potenciaciones similares los datos se muestran juntos.

Para analizar si el LTP producido en condiciones en donde la Cdk5 fue inhibida es debido a cambios pre o postsinápticos, se analizó la FPP. En estos registros se encontró que, en presencia de Roscovitine y después de la EAF no hay cambios en el valor de la FPP (pre EAF=1.26816±0.09474 vs post EAF= 1.10207±0.03568) (Fig. 9C), por otra parte, al analizar la constante de tiempo al pico, la cual es otro parámetro que permiten discernir con mayor eficacia componentes pre y postsináptico, se encontró que en los registros en donde se encontraba presente roscovitine, el valor de la constante no sufrió cambios (pre EAF= 0.74548±0.11457 vs post EAF= 0.71133±0.05773) (Fig. 9D). Sin embargo, es importante mencionar que al comparar el valor de la constante al pico en presencia y ausencia de roscovitine, se encontró un decremento en el valor de la constante (Control= 1.12099±0.084 vs Roscovitine 0.74548±0.11457) (Fig. 9E,F) lo que

sugiere que la inhibición de la Cdk5 produce cambios en la transmisión sináptica a nivel postsináptico.

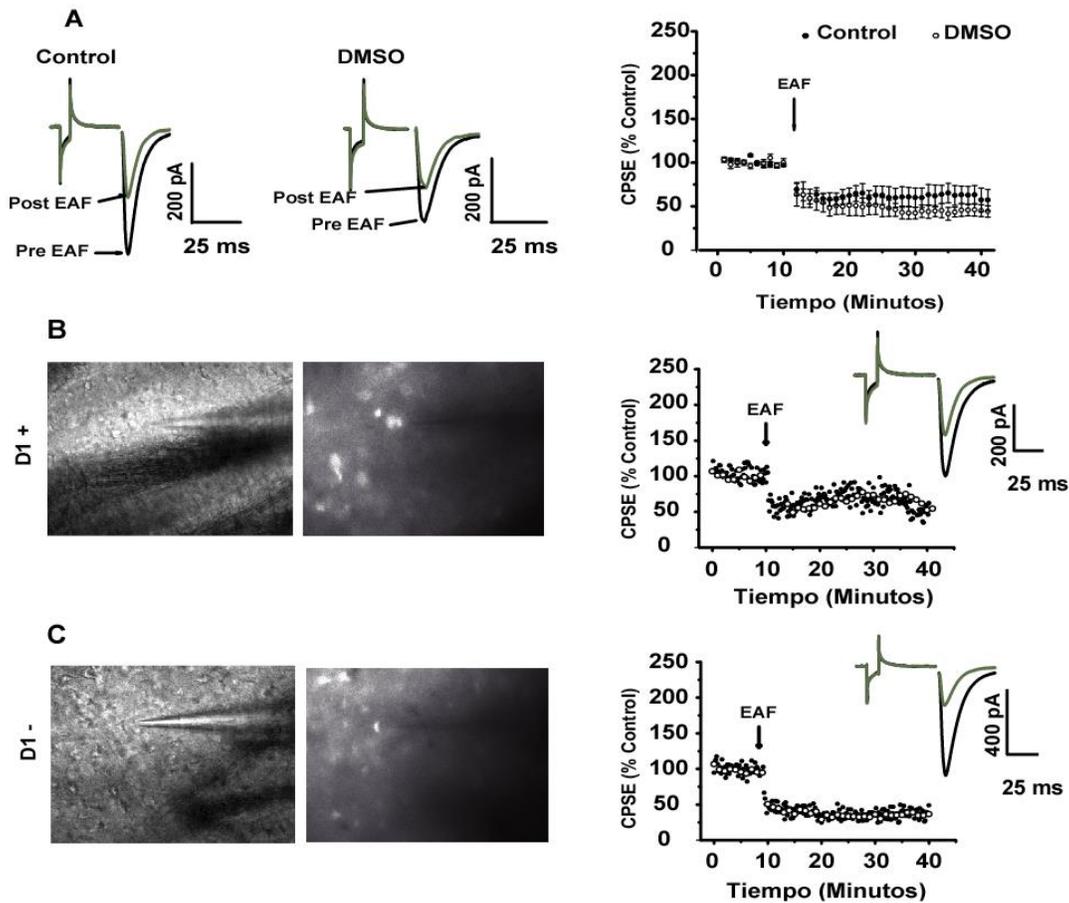


Figura 8.- La LTD se expresa en NEM D1+ y D1-. A) Izquierda.-Trazos representativos de registros de célula única antes y después de la EAF en condiciones control y en presencia de DMSO (vehículo de Roscovitine) Derecha.- Curso temporal de registros de célula única en condiciones control y en presencia de DMSO. B) izquierda.- Imagen que muestra el registro de una célula GFP+, D1+. Derecha.- Curso temporal que muestra la plasticidad sináptica después de la EAF en una neurona D1+. C) izquierda.- Imagen que muestra el registro de una célula GFP-, D1-. Derecha.- Curso temporal que muestra la plasticidad sináptica después de la EAF en una neurona D1-.

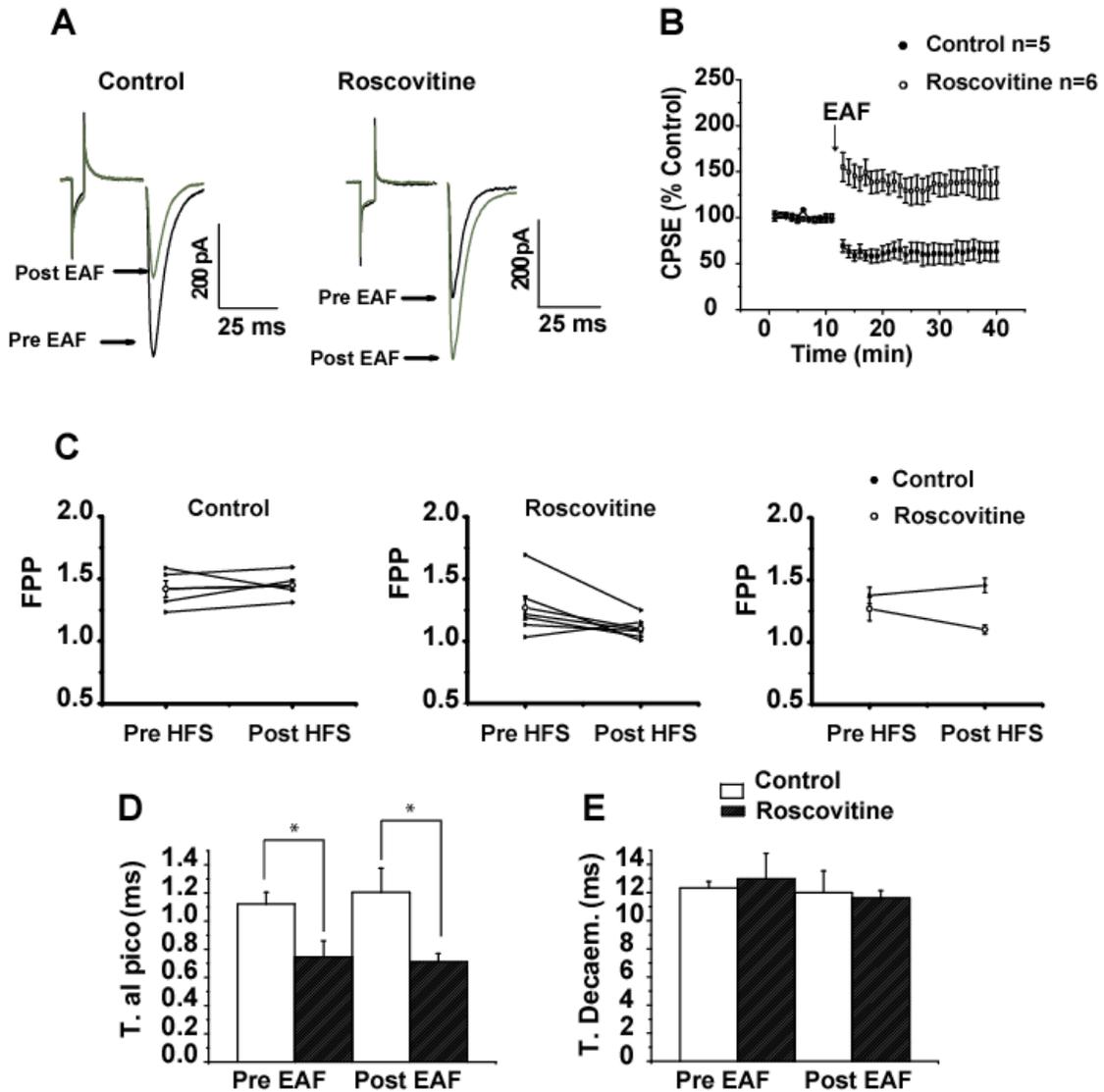


Figura 9.- La inhibición de la Cdk5 cambia el tipo de plasticidad de LTD a LTP en registros de célula única. A) Trazos representativos de registros de célula única en ausencia de Roscovitine (izquierda) y en presencia de Roscovitine (derecha). B) Curso temporal de registros de célula única en ausencia (círculos cerrados) y en presencia de Roscovitine (círculos abiertos). C) Análisis de la FPP de registros de célula única en ausencia de Roscovitine (izquierda) en presencia de Roscovitine (centro) y la comparación de ambas condiciones (derecha). D) Análisis de la constante de tiempo al pico de registros de célula única en ausencia (barras blancas) y en presencia de Roscovitine (barras negras) E) Análisis de la constante de tiempo de decaimiento de registros de célula única en ausencia (barras blancas) y en presencia de Roscovitine (barras negras).

## **El cambio de LTD a LTP por la inhibición de la Cdk5 tiene un componente presináptico y postsináptico**

Los datos obtenidos muestran que la inhibición de la Cdk5 favorece la LTP a través de favorecer la vía de señalización de los receptores D1/PKA/DARPP32/Canales de calcio tipo L/receptores NMDA. Varios de estos blancos celulares, así como la Cdk5, se encuentran expresados tanto en la presinapsis como en la postsinapsis. El análisis de la FPP sugiere que existe un componente presináptico. Sin embargo, el análisis de la constante al pico sugiere que es posible la participación de un efecto a nivel postsináptico. Se sabe que el análisis de la FPP no siempre permite dilucidar efectos a nivel presináptico cuando existe la participación simultánea de la postsinapsis. Debido a esto, y para conocer si el cambio en el tipo de plasticidad en las sinapsis corticoestriatales involucra solamente la inhibición de la Cdk5 en la postsinapsis, o bien en la pre y la postsinapsis, se realizaron 2 series de experimentos. En la primera serie de experimentos, se examinó si la inhibición de la Cdk5 solo en la postsinapsis era suficiente para el favorecimiento de la LTP. Para ello, se realizaron registros de célula única en los cuales se inhibió la Cdk5 únicamente en la postsinapsis al poner la Roscovitine en la pipeta de registro. Los resultados de estos experimentos muestran que después de la EAF se induce LTD en todos los registros que mostraron plasticidad (Pre EAF=  $101.54603 \pm 0.0581$  Post EAF=  $67.064 \pm 6.920$ ) (Fig. 10A). Este resultado indica que para el cambio de LTD a LTP por la inhibición de la Cdk5, es necesaria la inhibición de la Cdk5 en la presinapsis. Por otra parte, para conocer si son necesarios cambios en la postsinapsis para favorecer la LTP y tomando en cuenta que la actividad de la PKA es necesaria para el favorecimiento de la LTP, se realizaron experimentos en donde se inhibió a la Cdk5 en la pre y la postsinapsis al aplicar Roscovitine en el baño de perfusión y el inhibidor de la PKA solo en la postsinapsis. En estos experimentos, se encontró que después del tren de estimulación de alta frecuencia, no se indujo LTP, pero tampoco LTD (pre EAF=  $98.18412 \pm 1.19245$  vs post EAF=  $84.24724 \pm 8.00635$ ) (Fig. 10B). Este resultado muestra que existe un componente postsináptico mediado por la PKA en el favorecimiento de la LTP por la inhibición de la Cdk5. También sugiere que la inhibición de la Cdk5 en la presinapsis es suficiente para prevenir la inducción de la LTP.

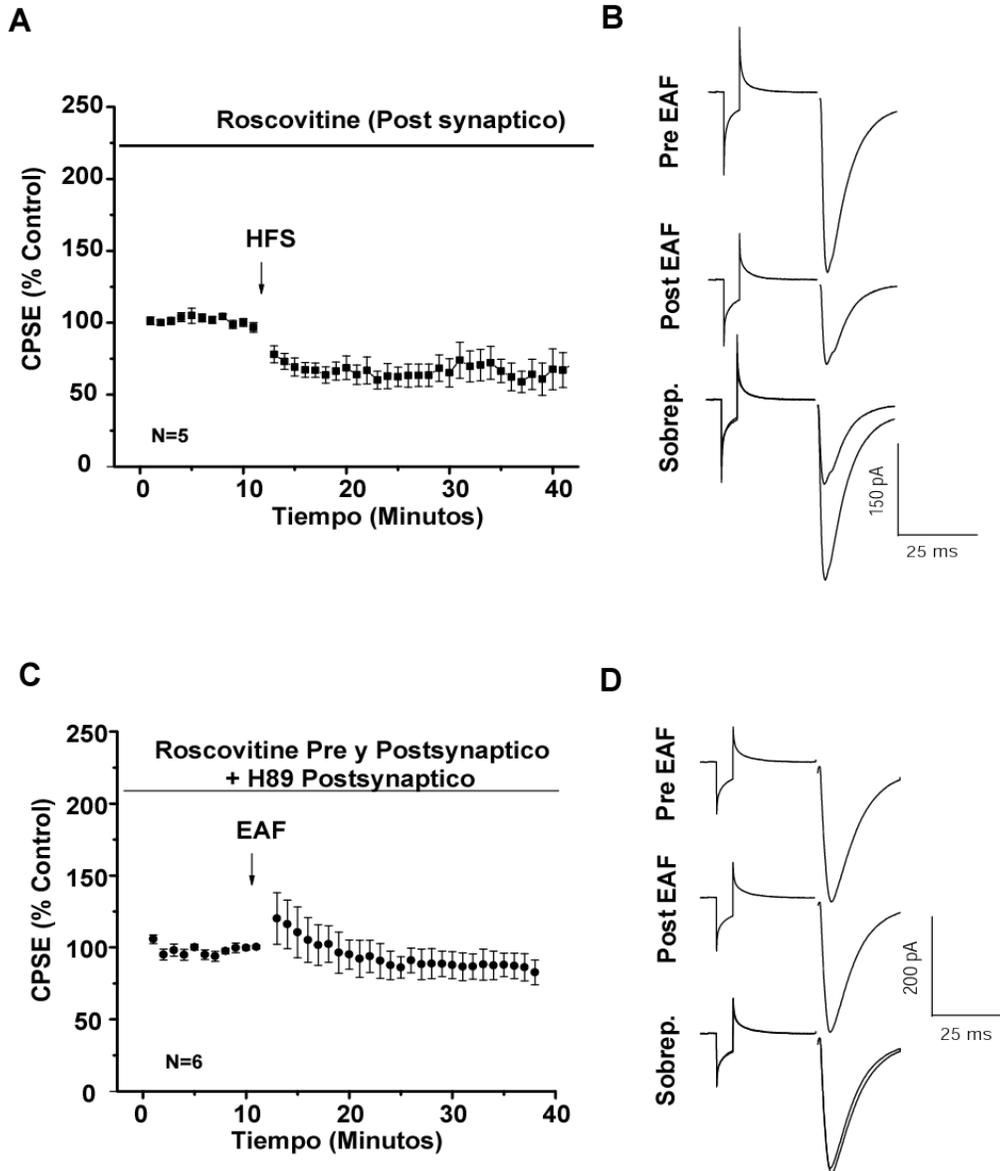


Figura 10.- La facilitación del LTP por la inhibición de la Cdk5 tiene un componente pre y postsináptico. A) Curso temporal de registros de célula única en presencia de Roscovitine en la pipeta de registro. B) Trazo representativo de un registro de célula única en presencia de Roscovitine en la pipeta de registro. C) Curso temporal de registros de célula única en presencia de Roscovitine en el baño de perfusión y H89 en la pipeta de registro. D) Trazo representativo de registros de célula única en presencia de Roscovitine en el baño de perfusión y H89 en la pipeta de registro.

## **Alteraciones en la plasticidad sináptica corticoestriatal tras la inhibición del complejo 2 mitocondrial: implicaciones de la Cdk5.**

### **La administración subcrónica de 3-NP produce alteraciones en la transmisión y plasticidad sináptica en el estriado.**

La administración de 3-NP produjo un incremento en la amplitud de las corrientes sinápticas espontáneas sin modificar la frecuencia de aparición de los eventos sinápticos, ni las constantes de tiempo al pico y decaimiento de los eventos (Fig 11). Adicionalmente, en registros de célula única se observó la pérdida de la LTD después de un tren de estimulación de alta frecuencia (control pre EAF=  $100.61974 \pm 0.64$  post EAF=  $56.14379 \pm 10.068$  vs 3NP pre EAF=  $99.37 \pm 0.86$  post EAF=  $87.42 \pm 9.45$  (Fig. 12), en su lugar se presentó una potenciación post-tetánica durante los primeros minutos después de la EAF (pre EAF=  $99.37452 \pm 0.86472$  post EAF PPT=  $132.37833 \pm 21.58382$ ) (Fig. 12).

### **La administración de 3-NP produce un incremento en la expresión de Cdk5.**

La Cdk5 está ampliamente expresada en el núcleo estriado, su actividad modula la transmisión sináptica, así como la plasticidad a largo plazo en las sinapsis corticoestriatales. Previamente se ha reportado el incremento en la expresión de Cdk5 en diferentes modelos de la EH, por lo que las alteraciones sinápticas observadas en los animales tratados con 3-NP pudieran deberse a cambios en la expresión de la Cdk5. Para conocer si la administración subcrónica de 3-NP modifica la expresión de la Cdk5 en el estriado se realizaron ensayos de inmunodetección con la técnica de WB en tejido proveniente de ratones tratados con 3-NP. En estos experimentos se encontró que la administración sistémica de 3-NP produce un incremento en la expresión de la Cdk5 de  $1.54 \pm 0.163$  veces con respecto al control (Fig. 13).

### **La administración de 3-NP incrementa la fosforilación de DARPP 32 en treonina 34 y 75.**

Previamente se demostró que en condiciones fisiológicas normales la Cdk5 modula la plasticidad sináptica a través de la fosforilación de la DARPP 32. Para conocer si el incremento en la expresión de la Cdk5 pudiera originar los cambios plásticos observados tras la administración de 3-NP, se evaluó el estado de fosforilación de la DARPP-32 en el residuo treonina 75, el cual es fosforilado directamente por la Cdk5 y en el residuo treonina 34, el cual es fosforilado por la PKA. El análisis

del estado de fosforilación de la DARPP 32 muestra que después de la administración intraperitoneal de 3-NP existe un incremento en la fosforilación del residuo treonina 75 de  $1.396 \pm 0.157$  con respecto al control mientras en el residuo treonina 34 existe un incremento de  $2.5019 \pm 0.579$  con respecto al control (Fig. 13). Es importante resaltar que la administración de 3-NP no produce cambios en la expresión de DARPP 32 total.

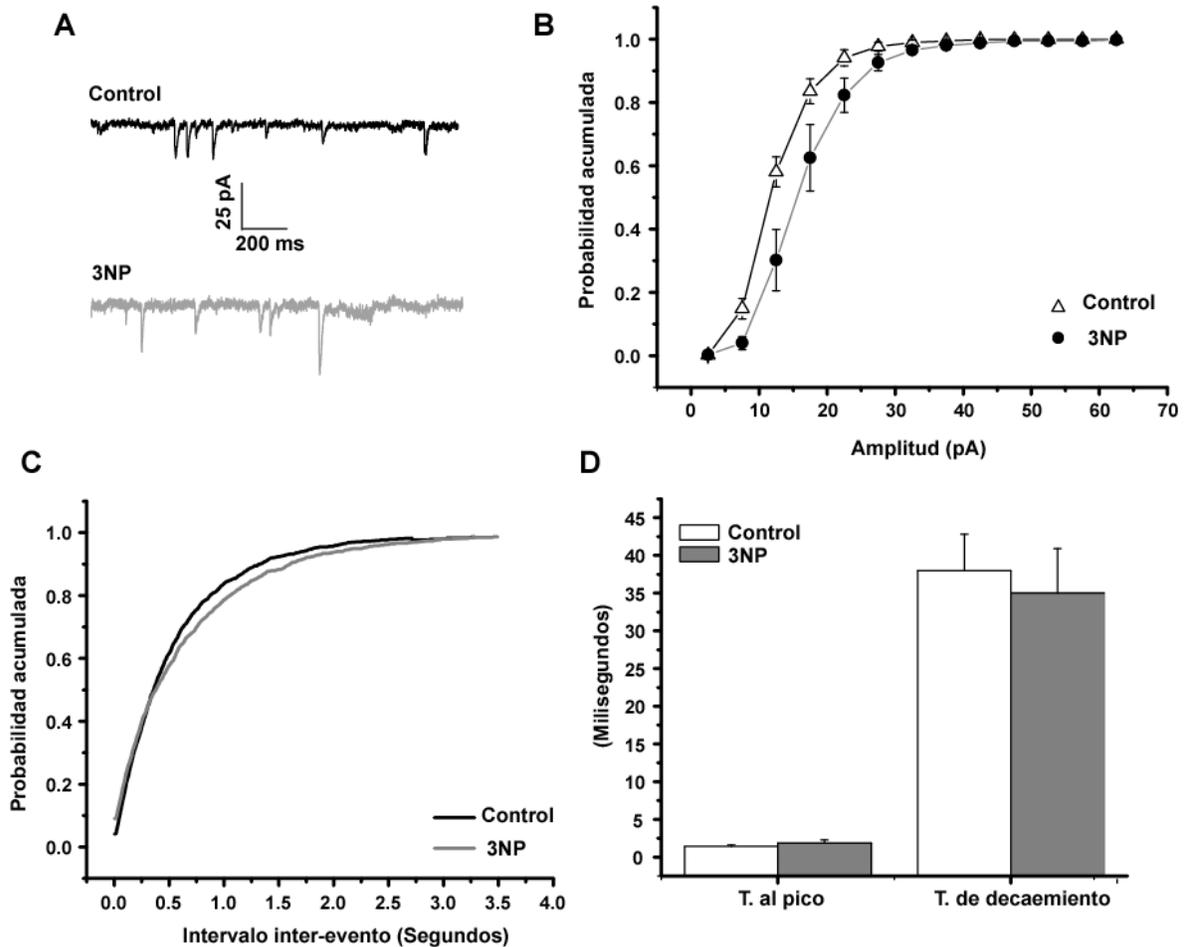


Figura 11.- Cambios en la transmisión sináptica basal en ratones tratados con 3NP. A) Trazos representativos de corrientes sináptica espontaneas de rebanadas de cerebro provenientes de ratones control (arriba) y ratones tratados con 3NP (abajo). B) Gráfica de probabilidad acumulada contra amplitud de los eventos espontáneos en ratones control (triángulos abiertos) y tratados con 3NP (círculos cerrados). C) Gráfica de probabilidad acumulada contra intervalo inter evento. D) Graficas de barras que muestran las constantes al pico (izquierda) y constante de decaimiento (derecha) en ratones control (barra blanca) y 3NP (barra gris)

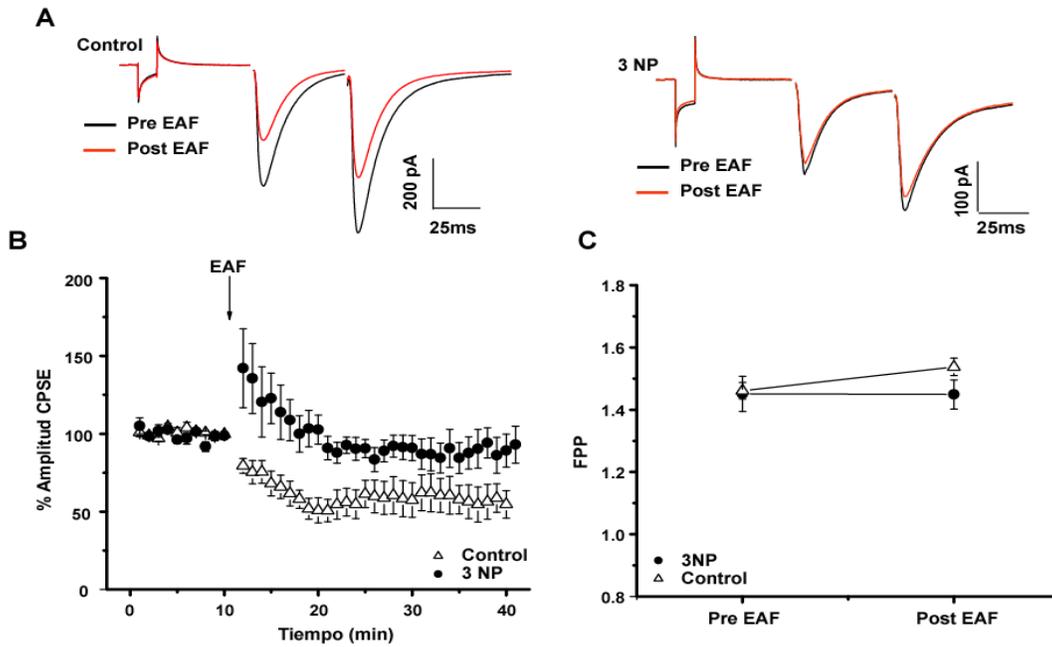


Figura 12.- No hay expresión de LTD en los ratones tratados con 3NP. A) trazos representativos de registros de célula única en rebanadas de cerebro provenientes de ratones control (izquierda) y tratados con 3NP (derecha). B) Curso temporal de registros de célula única en rebanadas de cerebro provenientes de ratones control (triángulos abiertos) y tratados con 3NP (círculos cerrados). C) Análisis de la FPP antes y después de la EAF de registros de célula única en rebanadas de cerebro provenientes de ratones control (triángulos abiertos) y tratados con 3NP (círculos cerrados).

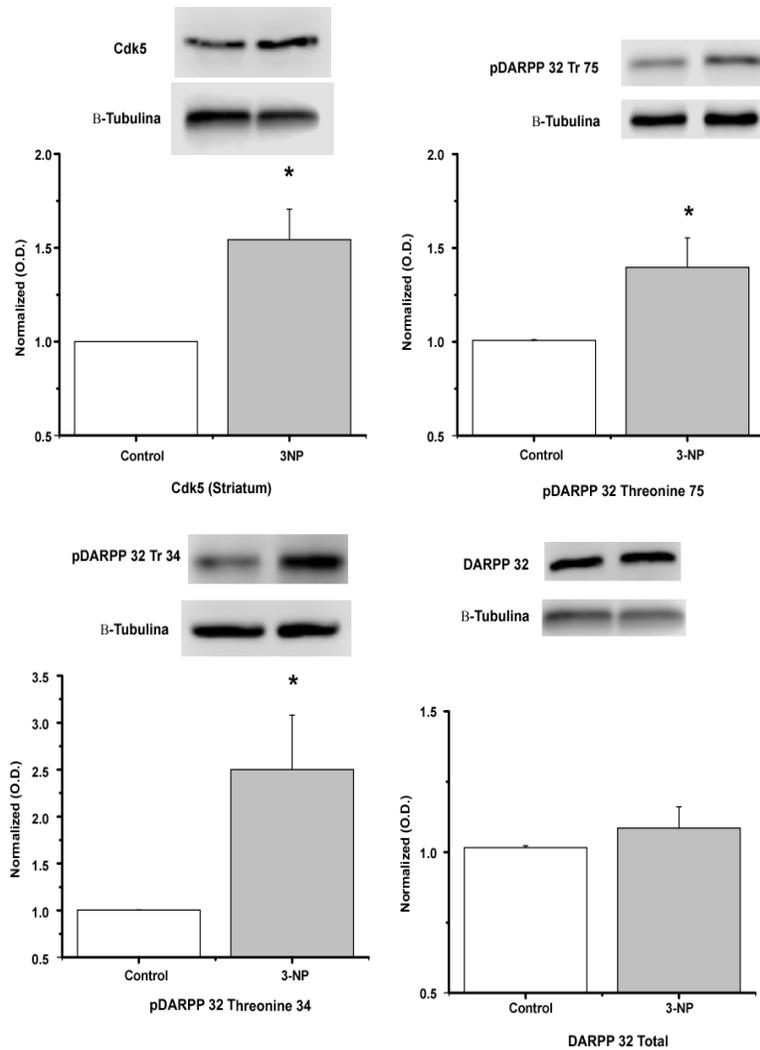


Figura 13.- EL tratamiento con 3NP incrementa la expresión de Cdk5 en el estriado así como la fosforilación de DARPP 32 en el residuo treonina 75 y treonina 34. A) arriba; imagen representativa de un WB contra Cdk5. Abajo; Gráfica de barras que muestra el incremento en la expresión de Cdk5 en el estriado de ratones tratados con 3NP. B) arriba; imagen representativa de un WB contra DARPP 32 fosforilada en treonina 75. Abajo; Gráfica de barras que muestra el incremento en la fosforilación de DARPP 32 en el residuo treonina 75 tras la administración sistémica de 3NP. C) arriba; imagen representativa de un WB contra DARPP 32 fosforilada en treonina 34. Abajo; Gráfica de barras que muestra el incremento en la fosforilación de DARPP 32 en el residuo treonina 34 tras la administración sistémica de 3NP D) arriba; imagen representativa de un WB contra DARPP 32. Abajo; Gráfica de barras que muestra que la administración de 3NP no genera cambios en la expresión de DARPP 32

### **La inhibición de la Cdk5 no restaura la plasticidad sináptica.**

Previamente se ha reportado que la Cdk5 participa en la expresión del LTD en el estriado, por lo que es posible que el incremento en la expresión de la Cdk5 en los animales tratados con 3-NP produzca alteraciones en la expresión de la LTD después de la EAF. Para estudiar la participación de la Cdk5 en la plasticidad estriatal de los animales tratados con 3-NP, se realizaron registros en presencia del inhibidor de la Cdk5 Roscovitine (20 $\mu$ M). Sorpresivamente en los registros en donde se encontraba presente Roscovitine, no se logró restaurar el LTD, por el contrario, se encontró que en presencia de Roscovitine y después de la AEF, se observó una LTP moderada (pre EAF= 100.92882  $\pm$  0.71113 post EAF= 116.19501  $\pm$  9.81041) (Fig. 14A, B). Al analizar la FPP encontramos que antes de la EAF, la FPP en los registros en donde se encontraba presente la Roscovitine, fue significativamente menor que en los registros en donde no se encontraba en el baño de perfusión (FPP 3NP= 1.45068 $\pm$ 0.05661 vs 3NP roscovitone= 1.22096 $\pm$ 0.07095). Por otra parte, cuando se analiza el cambio en la FPP antes y después de la EAF se encontró una disminución en la FPP cuando la Cdk5 fue inhibida (pre EAF=1.22096 $\pm$ 0.07095 vs post EAF= 1.10868 $\pm$ 0.03187) (Fig. 14C)

### **La inhibición de la Cdk5 en animales tratados con 3-NP produce un LTP que no depende de la activación de los receptores D1, pero sí de la actividad de la PKA.**

Previamente se había mostrado que la inhibición de la Cdk5 en condiciones fisiológicas normales producía un LTP que dependía de la vía de señalización D1/PKA/canales de calcio tipo L/receptores NMDA. Para conocer si el LTP obtenido después de la inhibición de la Cdk5 en ratones tratados con 3-NP, era igual al obtenido en condiciones fisiológicas normales, se realizaron registros en presencia de Roscovitine + el antagonista de receptores D1 (SCH 23390 1 $\mu$ M) y Roscovitine + inhibidor de PKA (H89 1 $\mu$ M). A diferencia de lo observado en condiciones fisiológicas normales, el bloqueo de los receptores D1 no previno la inducción de LTP (pre EAF= 100.2636 $\pm$ 0.42868 post EAF= 111.10159 $\pm$ 11.91204) (Fig. 15A,B), sin embargo la inhibición de la PKA sí previno la expresión del LTP (pre EAF= 99.64883 $\pm$ 0.38452 post EAF= 96.88136 $\pm$ 4.71687) (Fig. 16A,B). En ninguna de las dos condiciones hubo un cambio en la FPP antes y después de la EAF (FPP Rosc + SCH pre EAF= 1.19289 $\pm$ 0.06159 vs post EAF= 1.17753 $\pm$ 0.06109, FPP Roscovitine + H89 pre EAF= 1.1927 $\pm$ 0.04825 vs post EAF= 1.14795 $\pm$ 0.05672) (Fig15C y 16C).

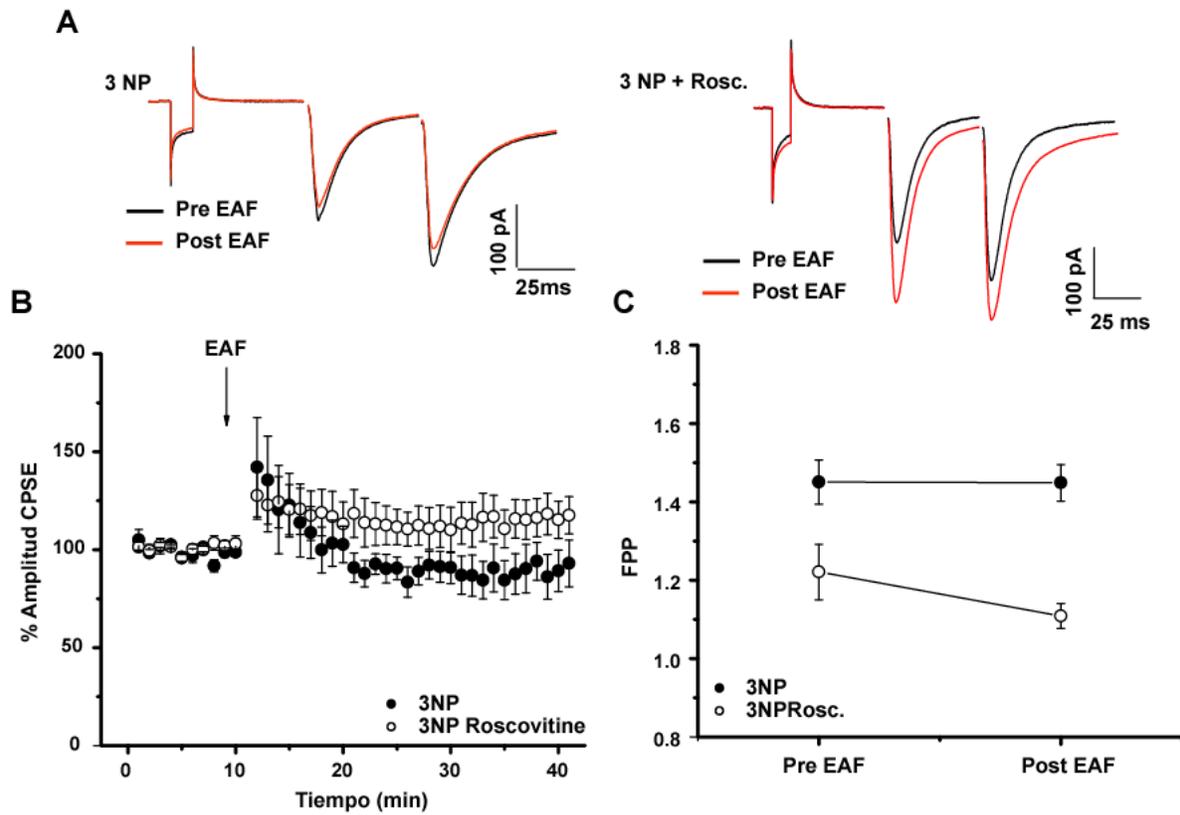


Figura 14.- La inhibición de la Cdk5 en animales tratados con 3NP no restaura la plasticidad y favorece la LTP. A) Trazos representativos de registros de célula única en rebanadas de cerebro de ratones tratados con 3NP (izquierda) y de ratones tratados con 3NP y en las que estuvo presente Roscovitine en el baño (derecha). B) Curso temporal de registros de célula única que muestra la plasticidad después de la EAF en rebanadas de cerebro de ratones tratados con 3NP (círculos cerrados) y de ratones tratados con 3NP y en las que estuvo presente Roscovitine en el baño (círculos abiertos) C) Análisis de la FPP antes y después de la EAF en ratones tratados con 3NP (círculos cerrados) y de ratones tratados con 3NP y en las que estuvo presente Roscovitine en el baño (círculos abiertos).

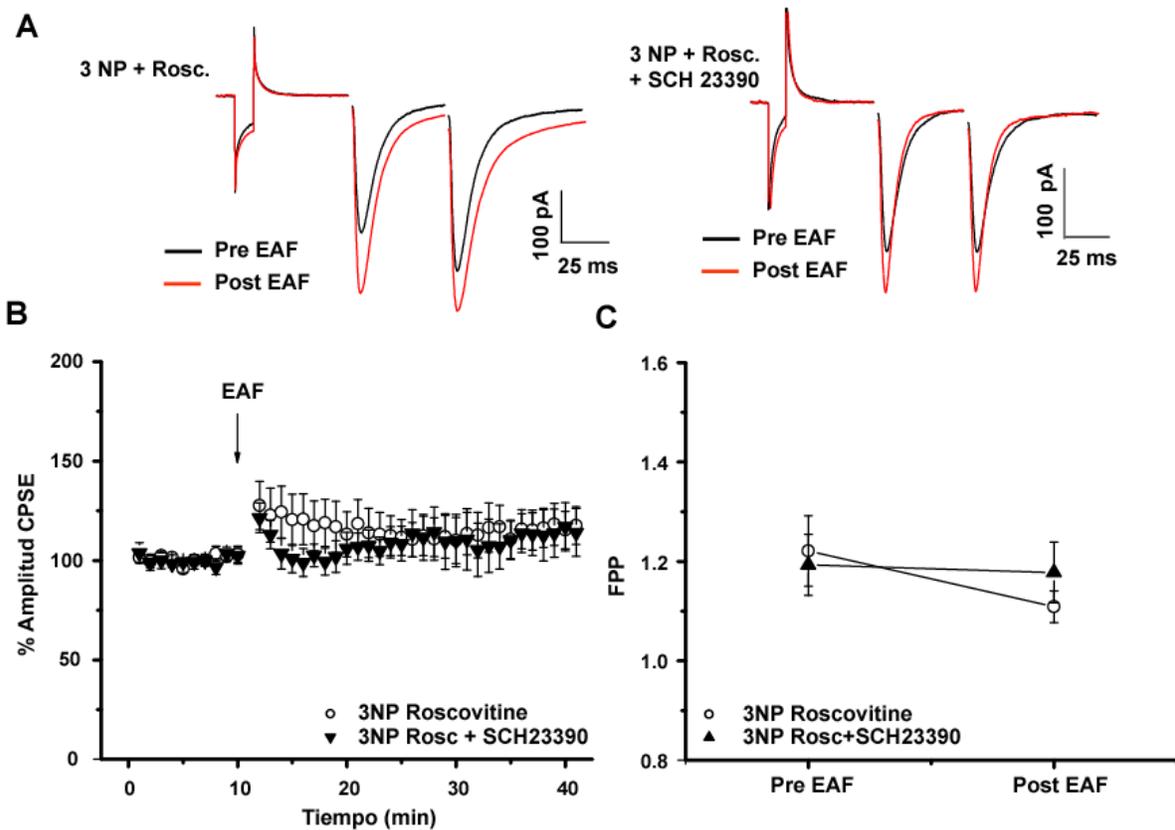


Figura 15.- El antagonista de los receptores D1 no previene el LTP producido por la inhibición de la Cdk5 en los ratones tratados con 3NP. A) Trazos representativos de registros de célula única en rebanadas de cerebro de ratones tratados con 3NP y Roscovitine (izquierda) y de ratones tratados con 3NP y en las que estuvo presente Roscovitine + SCH 23390 (derecha). B) Curso temporal de registros de célula única que muestra la plasticidad después de la EAF en rebanadas de cerebro de ratones tratados con 3NP y en presencia de Roscovitine (círculos cerrados) y de ratones tratados con 3NP y en las que estuvo presente Roscovitine + SCH 23390 en el baño (triángulos negros) C) Análisis de la FPP antes y después de la EAF en ratones tratados con 3NP y Roscovitine (círculos cerrados) y de ratones tratados con 3NP y en las que estuvo presente Roscovitine + SCH 23390 en el baño (triángulos negros).

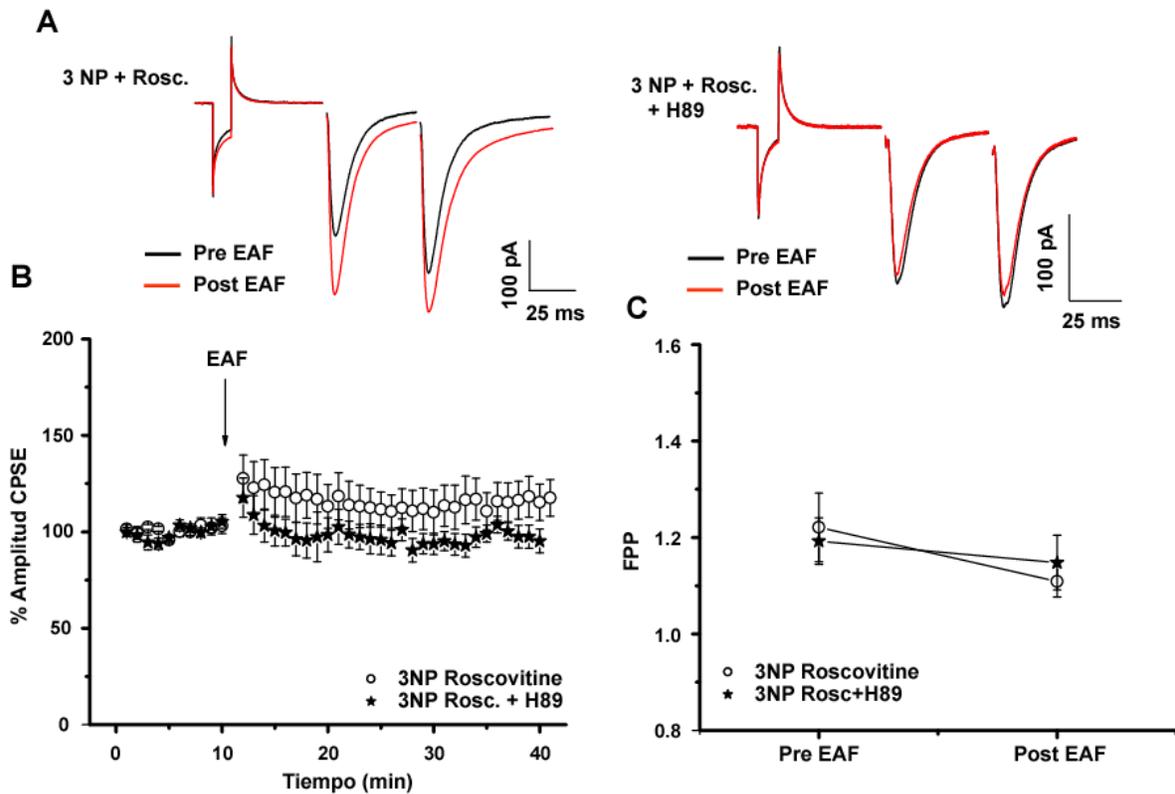


Figura 16- El inhibidor de la PKA H89 previene el LTP producido por la inhibición de la Cdk5 en los ratones tratados con 3NP. A) Trazos representativos de registros de célula única en rebanadas de cerebro de ratones tratados con 3NP y Roscovitine (izquierda) y de ratones tratados con 3NP y en las que estuvo presente Roscovitine + H89 (derecha). B) Curso temporal de registros de célula única que muestra la plasticidad después de la EAF en rebanadas de cerebro de ratones tratados con 3NP y en presencia de Roscovitine (círculos cerrados) y de ratones tratados con 3NP y en las que estuvo presente Roscovitine + H89 en el baño (estrellas) C) Análisis de la FPP antes y después de la EAF en ratones tratados con 3NP y Roscovitine (círculos cerrados) y de ratones tratados con 3NP y en las que estuvo presente Roscovitine + H89 en el baño (estrellas).

## **Discusión:**

Los procesos de plasticidad sináptica en el estriado han sido estudiados arduamente. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a estos fenómenos aun no son comprendidos por completo. En este trabajo se mostró, por primera vez, el papel de la Cdk5 en la plasticidad sináptica corticoestriatal en condiciones fisiológicas normales y en un modelo de la EH.

### **Papel de la Cdk5 en la plasticidad corticoestriatal en condiciones fisiológicas normales**

Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que la inhibición de la Cdk5, a través del inhibidor específico Roscovitine, favorece la excitabilidad del núcleo estriado al modular positivamente la transmisión glutamatérgica y favorecer la inducción de la LTP corticoestriatal.

El uso del inhibidor específico de la Cdk5, Roscovitine, incrementó la transmisión glutamatérgica medida con potenciales de campo. Previamente, Chergui y colaboradores reportaron que la inhibición de la Cdk5 incrementa las corrientes activadas por los receptores NMDA (Chergui et al., 2004). Sin embargo, debido a las condiciones experimentales en las que se realizaron los registros electrofisiológicos, en donde estaba presente el magnesio en el medio extracelular, el cual bloquea los receptores NMDA, la participación de este tipo de receptores en el incremento de la transmisión glutamatérgica es poco probable. Por otra parte, la disminución en el pulso pareado sugiere que la modulación en la transmisión glutamatérgica producida por la inhibición de la Cdk5 tiene un componente presináptico. Se ha reportado que la inhibición de la Cdk5 incrementa la liberación de neurotransmisor en sinapsis de hipocampo al modular la conductancia del poro de fusión (Barclay et al., 2004), accediendo al pool de vesículas de reserva (Kim and Ryan 2010) y al incrementar las corrientes de calcio de canales P/Q y N (Tomizawa et al., 2002 y Su et al., 2012), las cuales se sabe participan en la liberación de neurotransmisor en las terminales corticoestriatales (Bargas et al., 1998). Es posible que el incremento en la amplitud de los

potenciales de campo por la inhibición de la Cdk5 se deba a una mayor liberación de glutamato de las terminales corticoestriatales a través de uno o varios de los mecanismos anteriores.

De igual manera, se reportó que la inhibición de la Cdk5 produce cambios en el tipo y magnitud de la plasticidad corticoestriatal. Previamente se ha encontrado en regiones como el hipocampo, que la Cdk5 es importante para el establecimiento de la plasticidad sináptica, ya que la inhibición de la Cdk5 previene la inducción de la LTD (Ohshima et al., 2005) y la LTP (Li et al., 2001) (aunque existen reportes que muestra que ratones KO condicionales de Cdk5 tienen un incremento en la LTP [Hawasli et al., 2007]). Este trabajo muestra que en el estriado, la inhibición de la Cdk5 favorece la inducción de la LTP, al mismo tiempo que disminuye la inducción de la LTD. Anteriormente se ha reportado que la LTP puede inducirse con estimulación de alta frecuencia solo en ausencia de magnesio (Calabresi et al., 1992b; Mahon et al., 2004; Lovinger, 2010). Si bien existen otros protocolos de estimulación en el estriado capaces de inducir LTP en presencia de magnesio, la mayoría de ellos se basan de igual forma en la activación de los receptores NMDA a través de despolarizaciones (Fino y Venance, 2010; Hawes et al., 2013; Agustin et al., 2014). La necesidad de los receptores NMDA para la inducción de la LTP, se basa en su cualidad de ser permeables a calcio, por tanto, su activación produce el incremento en la concentración de calcio intracelular que finalmente favorece la activación de vías de señalización que facilitan la inducción de la LTP (Calabresi et al., 1992, Surmier et al., 2007). Interesantemente, la inhibición de la Cdk5 permite la expresión de la LTP aun en presencia de magnesio e inclusive en presencia de un antagonista de los receptores NMDA como el AP5. Lo anterior sugiere que el mecanismo que subyace a la inducción de la LTP por la inhibición de la Cdk5 no depende, al menos por completo, de la activación de los receptores NMDA. Es probable que la Cdk5 module negativamente las entradas de calcio a la célula o bien, que las vías de señalización que regulan las entradas de calcio, favorezca el influjo de calcio, permitiendo así la expresión de la LTP.

Una de las vías de señalización en las que participa la Cdk5 y que se ha relacionado con la plasticidad estriatal es la señalización dopaminérgica, cuya activación modifica la concentración de calcio intracelular (Centonze et al., 2001; Reynolds et al., 2002; Wang et al., 2006; Lovinger, 2010). Los datos obtenidos en presencia de los antagonistas de receptores dopaminérgicos indican que, el favorecimiento de la LTP por la inhibición de la Cdk5 depende de la activación de receptores D1 y D2. Se ha reportado previamente que la activación de los receptores D1 es importante para el desarrollo de la LTP en el estriado (Calabresi et al., 1992, Calabresi et al., 2000, Centonze et al., 2001). La Cdk5 modula la señalización de los receptores D1 a nivel de la DARPP-32 al fosforilar el residuo treonina 75 (Bibb et al., 1999 y Chergui et al., 2004). Se sabe que la DARPP-32 es importante para los fenómenos de plasticidad, ya que su supresión impide la inducción de la LTP y la LTD en el estriado (Calabresi et al., 2001), esto puede deberse a su papel como integrador de la señal dopaminérgica y glutamatérgica. Los resultados obtenidos del análisis del estado de fosforilación de la DARPP-32 mostraron que la inhibición de la Cdk5 por Roscovitine, decremента la fosforilación del residuo treonina 75 e incrementa la fosforilación del residuo treonina 34. El incremento en la fosforilación del residuo treonina 34 es consecuencia de la disminución de la fosforilación del residuo treonina 75. La fosforilación del residuo treonina 75 convierte a la DARPP-32 en un inhibidor de la PKA (Bibb et al 1999), la disminución en la fosforilación del residuo treonina 75 desinhibe a la PKA favoreciendo la fosforilación del residuo treonina 34. Así mismo, en condiciones de alto potasio, la inhibición de la Cdk5 incrementa la fosforilación del residuo treonina 34 de la DARPP-32. El incremento en la fosforilación de DARPP-32 en treonina 34 es mayor al ocurrido en condiciones normales de potasio. Las concentraciones de alto potasio producen una despolarización masiva similar a la producida por la EAF, por lo que es probable que la EAF produzca un efecto similar en el estado de fosforilación de la DARPP-32. El incremento en la fosforilación de la DARPP-32 en treonina 34 en ambas condiciones muestra que tanto la inhibición

de la Cdk5 así como la EAF favorecen la vía de señalización de los receptores D1. Este favorecimiento tiene como consecuencia el incremento en la inducción de la LTP.

Por otra parte, los receptores D2 usualmente se han relacionado con la expresión de LTD. Sin embargo, los experimentos en donde estuvo presente sulpiride + roscovitine muestran que, al menos en parte, el incremento en la LTP producido por la inhibición de la Cdk5 depende de la activación de estos receptores. Se conoce que los receptores D2 activan a la PKC (Surmier et al., 2007), la cual se ha reportado que participa en la expresión de la LTP (Gubellini et al., 2004). Adicionalmente, los receptores D2 modulan la actividad de la DARPP-32 a través de la activación de la PP2B y la inhibición de la PKA. Se sabe que a nivel postsináptico la actividad de la PKA y la PKC modulan la transmisión glutamatérgica y la plasticidad sináptica (Landwehrmeyer et al., 1995, Scannevin et al., 2000; Surmier et al., 2007) por lo que es probable que alguna de estas vías de señalización activadas por los receptores D2 participe en el favorecimiento de la LTP por la inhibición de Cdk5. Por otra parte, se conoce que los receptores D2 se encuentran expresados en las terminales presinápticas y modulan la liberación de neurotransmisor (Bamford et al., 2004). Los datos obtenidos del análisis de la FPP muestran que, la LTP inducida por la inhibición de la Cdk5 tiene un componente presináptico. Por lo que es posible que este componente se encuentre relacionado con la activación de los receptores D2 en las terminales presinápticas.

La activación de la PKA parece ser fundamental para el favorecimiento de la LTP por la inhibición de la Cdk5. Los datos obtenidos de los registros en donde se encontraba presente roscovitine + H89 muestran que la inhibición de la PKA previene la inducción de la LTP, en especial la inhibición a nivel postsináptico de la PKA es suficiente para prevenir la inducción de la LTP. A nivel postsináptico, la PKA modula, entre otras cosas, la entrada de calcio a la célula a través de fosforilar canales iónicos permeables a calcio como los canales de calcio tipo L (Hernández-López

et al., 1997) y los receptores NMDA (Flores-Hernández et al., 2002). La fosforilación del receptor NMDA y de los canales de calcio tipo L por la PKA produce un incremento en su conductancia al ser activados, lo que puede generar un incremento en la concentración de calcio intracelular y favorecer la excitabilidad neuronal y la expresión de LTP (Mahon et al., 2004). Los experimentos que se reportan aquí en presencia de Roscovitine + AP5 y Roscovitine + Nifedipine mostraron que los receptores NMDA y los canales de calcio tipo L participan en el favorecimiento de la LTP por la inhibición de la Cdk5. Cabe destacar que la activación de los canales de calcio tipo L y no los receptores NMDA es indispensable para la expresión de la LTP por la inhibición de la Cdk5. Esta observación muestra un nuevo papel de los canales de calcio tipo L en la LTP corticoestriatal que no había sido reportado anteriormente.

Es importante mencionar, que a pesar del uso de diferentes fármacos que lograron prevenir el favorecimiento de la LTP producido por la inhibición de la Cdk5, no fue posible restaurar la LTD en las sinapsis corticoestriatales. Por lo que es posible que los mecanismos por los cuales la Cdk5 modula la LTD sean diferentes a los que modulan la LTP. Se sabe que a pesar de que la inducción de la LTD es a nivel postsináptico, su expresión es a nivel presináptico e involucra una disminución en la liberación de neurotransmisor (Wang et al., 2006, Ademark et al., 2009, Lovinger, 2010). La Cdk5 se encuentra altamente expresada en las neuronas piramidales de la corteza. Previamente se ha mostrado en este trabajo que la inhibición de la Cdk5 modula la liberación de glutamato en las terminales corticoestriatales, por lo que es probable que los mecanismos por los cuales la Cdk5 modula la liberación de neurotransmisor, participen en la expresión de la LTD, y que el bloqueo de la Cdk5 en la presinápsis impida la expresión de la LTD. En apoyo a esta idea se encuentran los datos que muestran que para poder prevenir la expresión de LTD en los registros de célula única es necesario inhibir la actividad de la Cdk5 en la presinápsis, ya que la inhibición solo a nivel postsináptico no fue suficiente para prevenir la expresión de la LTD.

## **Papel de la Cdk5 en la plasticidad corticoestriatal en un modelo de la EH**

La Cdk5 modula la plasticidad sináptica en condiciones fisiológicas normales a nivel pre y postsináptico. A nivel presináptico controla negativamente la liberación de glutamato y la expresión de la LTD. A nivel postsináptico regula negativamente la señalización dopaminérgica al inhibir a la PKA a través de la DARPP32 y controla la expresión de la LTP. Se ha reportado que en diferentes modelos de neurodegeneración existe un incremento en la expresión y actividad de la Cdk5 (Takahashi et al., 2000, Luo et al., 2005, Hallows et al., 2006, Alvira et al., 2008). La desregulación en la actividad de la Cdk5 puede producir alteraciones sinápticas y plásticas que pueden contribuir con los procesos degenerativos. En este trabajo se estudiaron las alteraciones sinápticas ocurridas en un modelo de la EH basado en la administración de la toxina mitocondrial 3-NP y el papel que tiene la Cdk5 en ellas.

Los datos presentados muestran que la administración subcrónica en concentraciones no tóxicas de 3-NP produce alteraciones en la transmisión sináptica basal. Al medir las corrientes sinápticas espontáneas se encontró un incremento en la amplitud, pero no en la frecuencia de los eventos espontáneos. El cambio en la amplitud, mas no en la frecuencia sugiere que las alteraciones en la transmisión basal tienen un origen postsináptico. Se han encontrado alteraciones similares en la transmisión sináptica basal en modelos transgénicos de la EH, principalmente en animales pre sintomáticos (Cepeda et al., 2003), lo que sugiere que la administración sistémica por 5 días de 3-NP recrea las primeras etapas de la EH. Datos del laboratorio han mostrado que la administración de 3-NP a estas dosis produce cambios anatómicos en las NEM caracterizados por una disminución en el tamaño del árbol dendrítico, así como del número de espinas dendríticas (Mendoza et al., 2014). El decremento en el tamaño del árbol dendrítico puede ocasionar que disminuya el decaimiento electro tónico y favorecer la presencia de los eventos de gran amplitud. Cabe

destacar que a pesar de que con el análisis de los eventos espontáneos no se observaron cambios presinápticos asociados con la liberación de neurotransmisor; en el laboratorio se ha observado que este modelo produce un decremento en la liberación de neurotransmisor (Mendoza et al., 2014). Sin embargo, a diferencia de nuestros datos, los experimentos que muestran cambios en la liberación de neurotransmisor se basan en el análisis de la transmisión sináptica evocada y no espontánea lo cual puede explicar la diferencia.

Al analizar la plasticidad sináptica corticoestriatal en el modelo de la EH, se encontró que se pierde la capacidad de inducir la LTD por la EAF, así como la presencia de una PPT moderada. Anteriormente se había reportado que la administración de 3-NP produce la pérdida de la LTD y favorece la expresión de la LTP (Gubellini et al., 2003, Dalbem et al., 2005, Akopian et al., 2008). Sin embargo, estos reportes se basan en la administración aguda, y generalmente de altas dosis de 3-NP, lo cual asemeja más a un modelo de hipoxia que un modelo de la EH. En modelos transgénicos de la EH se han encontrado también alteraciones en la plasticidad sináptica, principalmente en la depotenciación de las sinapsis corticoestriatales (Dalbem et al., 2005). Las diferencias en las alteraciones sinápticas observadas entre los modelos transgénicos y este modelo, pueden deberse a diferentes mecanismos celulares que llevan a la degeneración y a las etapas de la enfermedad que recrean ambos modelos.

Así mismo, se mostró que los animales tratados con 3-NP mostraron un incremento en la expresión de la Cdk5, lo cual concuerda con reportes de modelos transgénicos y farmacológicos que han mostrado un incremento en la expresión de la Cdk5 (Crespo-biel et al., 2007, Sun et al., 2008, Park et al., 2012). El incremento en la expresión de la Cdk5, usualmente se ha relacionado con el favorecimiento de estrés oxidativo y mecanismos que favorecen la muerte neuronal, sin embargo, ningún reporte ha relacionado a la Cdk5 con cambios plásticos en modelos de la EH.

Los datos presentados muestran que la inhibición de la Cdk5 no logró restablecer la LTD. Por el contrario, similar a lo ocurrido en condiciones fisiológicas normales, la inhibición de la Cdk5 produjo la presencia de un LTP moderado. Es importante resaltar que la LTP producida en los animales tratados con 3-NP difiere a la inducida en condiciones fisiológicas normales, ya que ésta no es afectada por el bloqueo de los receptores D1, pero sí por la inhibición de la PKA.

La incapacidad de restaurar la LTD por la inhibición de la Cdk5 sugiere que el incremento en la expresión de la Cdk5 no subyace a la pérdida de la LTD. Por el contrario, es posible que el incremento de la expresión de la Cdk5 sea un mecanismo compensatorio a la pérdida del LTD. En condiciones fisiológicas normales la actividad de la Cdk5 favorece la inducción de la LTD, en parte, al inhibir la señalización de los receptores D1 en la postsinápsis (Miranda-Barrientos et al., 2014). Se ha reportado que en etapas tempranas de la enfermedad, existe un incremento en la concentración de dopamina en el núcleo estriado así como de la señalización dopaminérgica (Chen et al., 2013, Cepeda et al., 2014). El incremento en la concentración de dopamina se ha relacionado previamente con la expresión de la LTP (Calabresi et al., 2007) y con procesos de excitotoxicidad en modelos de la EH (Tang et al., 2007). El análisis de la fosforilación del residuo treonina 34 de DARPP-32 muestra un incremento en la fosforilación de este residuo en los animales tratados con 3-NP, lo cual sustenta la idea de que en este modelo existe un incremento en la transmisión dopaminérgica que pudiera favorecer la pérdida de la LTD.

En otras regiones del sistema nervioso como el núcleo accumbens, la Cdk5 incrementa su expresión en respuesta a la administración de drogas de abuso (Benavides et al., 2007) que incrementan la concentración de dopamina extracelular y favorecen la expresión de la LTP (Lovinger et al., 2003). En el estriado es posible que la administración de 3-NP incremente la transmisión dopaminérgica favoreciendo la fosforilación de DARPP32 en el residuo treonina 34. A

consecuencia de este incremento, la Cdk5 incrementa su expresión como mecanismo de regulación de la transmisión dopaminérgica y para frenar la inducción de LTP. La no dependencia de la LTP de la activación de receptores D1, pudiera deberse a la previa activación de estos receptores por el incremento en la dopamina extracelular. Sin embargo, los receptores D1 solo se encuentran expresados en las NEM que conforman la vía directa, por lo que es posible que otros mecanismos adicionales a la activación de los receptores D1 se encuentren involucrados en la expresión de la LTP, principalmente en la NEM de la vía indirecta, en los animales tratados con 3NP. Cabe destacar que la dependencia de la actividad de la PKA en la LTP de los animales tratados con 3NP pudiera reflejar la relación entre la vía D1/PKA/DARPP32/Cdk5 como responsable de la inducción de la LTP en las neuronas de la vía directa, por otra parte en la neuronas de la vía indirecta es posible que otros sistemas de neuromodulación como el de los receptores A2A que se sabe que activan a PKA (Chern et al., 1995, Kull et al., 2000) pudieran estar relacionados con el LTP.

Usualmente el incremento en la actividad y expresión de la Cdk5 se relaciona con el favorecimiento de procesos excitotóxicos debido a la producción de p25 por el incremento en la concentración de calcio intracelular (Kerokoski et al., 2004, Crespo-biel 2009). Sin embargo, este trabajo muestra que es posible que el incremento en la expresión de la Cdk5, sea a través de un mecanismo compensatorio para frenar la LTP y la excitotoxicidad causada por la administración de 3-NP.

La Cdk5 ha sido señalada como posible blanco terapéutico para el tratamiento de la EH, así como otras enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo, así como algunos otros que han mostrado que la actividad de la Cdk5 previene el daño producido por

el corte de la Huntingtina mutada (Luo et al., 2005), obligan al replanteamiento de esta idea y señalan la necesidad de estudiar el papel de la Cdk5 en las diferentes etapas de la EH.

## Conclusiones:

- La Cdk5 participa en la plasticidad sináptica corticoestriatal favoreciendo la expresión de la LTD.
- La inhibición de la Cdk5 favorece la excitabilidad en el estriado al incrementar la transmisión sináptica y favorecer la inducción de la LTP.
- El favorecimiento de la LTP por la inhibición de la Cdk5 tiene un componente pre y postsináptico
- La inhibición de la Cdk5 favorece la LTP a nivel postsináptico por la vía de receptores dopaminérgicos/PKA/DARPP-32/Canales de calcio tipo L/receptores NMDA
- En el modelo de la EH basado en la administración de 3-NP, existen cambios en la plasticidad sináptica caracterizados por la pérdida del LTP y la presencia de una PPT
- El incremento en la expresión de la Cdk5 no es la causa de los cambios plásticos observados por la administración de 3-NP
- La inhibición de la Cdk5 en el modelo de la EH favorece la expresión de la LTP, similar que en condiciones fisiológicas normales.

# The Cdk5 inhibitor Roscovitine increases LTP induction in corticostriatal synapses

Jorge Miranda-Barrientos\*†, Elizabeth Nieto-Mendoza\*† and Elizabeth Hernández-Echeagaray\*<sup>1</sup>

\*Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala, UNAM, México

†Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Cite this article as: Miranda-Barrientos J, Nieto-Mendoza E and Hernández-Echeagaray E (2014) The Cdk5 inhibitor Roscovitine increases LTP induction in corticostriatal synapses. ASN NEURO 6(2):art:00140.doi:10.1042/AN20140006

## ABSTRACT

In corticostriatal synapses, LTD (long-term depression) and LTP (long-term potentiation) are modulated by the activation of DA (dopamine) receptors, with LTD being the most common type of long-term plasticity induced using the standard stimulation protocols. In particular, activation of the D1 signaling pathway increases cAMP/PKA (protein kinase A) phosphorylation activity and promotes an increase in the amplitude of glutamatergic corticostriatal synapses. However, if the Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) phosphorylates the DARPP-32 (dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa) at Thr<sup>75</sup>, DARPP-32 becomes a strong inhibitor of PKA activity. Roscovitine is a potent Cdk5 inhibitor; it has been previously shown that acute application of Roscovitine increases striatal transmission via Cdk5/DARPP-32. Since DARPP-32 controls long-term plasticity in the striatum, we wondered whether switching off Cdk5 activity with Roscovitine contributes to the induction of LTP in corticostriatal synapses. For this purpose, excitatory population spikes and whole cell EPSC (excitatory postsynaptic currents) were recorded in striatal slices from C57/BL6 mice. Experiments were carried out in the presence of Roscovitine (20 μM) in the recording bath. Roscovitine increased the amplitude of excitatory population spikes and the percentage of population spikes that exhibited LTP after HFS (high-frequency stimulation; 100Hz). Results obtained showed that the mechanisms responsible for LTP induction after Cdk5 inhibition involved the PKA pathway, DA and NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor activation, L-type calcium channels activation and the presynaptic modulation of neurotransmitter release.

Key words: Cdk5, dopamine, PKA, plasticity, Roscovitine, striatum

## INTRODUCTION

Striatal MSN (medium spiny neurons) exhibit short-term and long-term plasticity (Surmeier et al., 2009). Synaptic plasticity can produce a reduction in the amplitude of synaptic response, called depression, or an increase in synaptic response amplitude, namely potentiation. It has been described that LFS (low-frequency stimulation) and HFS (high-frequency stimulation), respectively, produce striatal LTD (long-term depression), whereas LTP (long-term potentiation) is generated only with HFS or with some pharmacological manipulations (Calabresi et al., 1992a).

Striatal synaptic plasticity is modulated by DA (dopamine) (Calabresi et al., 1992b, 2000); the activation of D1 receptors increases cAMP and PKA (protein kinase A) levels. PKA, in turn, phosphorylates the DARPP-32 (dopamine-cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa) at the Thr<sup>34</sup> residue. When DARPP-32 is phosphorylated at Thr<sup>34</sup>, it inhibits the activity of protein phosphatase PP1 (protein phosphatase 1) (Hemmings et al., 1984; Nishi et al., 1999a). Nevertheless, if DARPP-32 is phosphorylated on its Thr<sup>75</sup> residue, DARPP-32 becomes a potent inhibitor of PKA and D1 receptor signaling (Bibb et al., 1999).

It has been proposed that DARPP-32 controls the expression of striatal LTD and LTP (Calabresi et al., 2000). If the phosphorylation of DARPP-32 at its Thr<sup>75</sup> residue inhibits PKA, we hypothesize that the kinase that phosphorylates the Thr<sup>75</sup> residue in the DARPP-32 may participate directly or indirectly in the underlying mechanisms of striatal plasticity.

Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) phosphorylates DARPP-32 at the Thr<sup>75</sup> residue (Bibb et al., 1999), and inhibits the D1 receptor signaling pathway. In the striatum, Cdk5 modulates synaptic transmission. Roscovitine, a potent Cdk5 inhibitor increases glutamatergic transmission in the striatum through the Cdk5/DARPP-32 pathway (Chergui et al., 2004); however, its role in synaptic plasticity has not yet been elucidated.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email: elihernandez@campus.iztacala.unam.mx)

**Abbreviations:** ACSF, artificial cerebrospinal fluid; AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid; Ca, calcium; Cdk5, cyclin-dependent kinase 5; DA, dopamine; DARPP-32, dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa; EPSC, excitatory postsynaptic currents; HFS, high-frequency stimulation; KA, kainate; LFS, low-frequency stimulation; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; MSN, medium spiny neurons; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PKA, protein kinase A; PP1, protein phosphatase 1; PPR, pair pulse ratio; SP, substance P.

© 2014 The Author(s). This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Licence (CC-BY)

(http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/) which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The present study demonstrated that Roscovitine increased the percentage of experiments that exhibit LTP induction, as well as the amplitude of population spikes recorded in glutamatergic corticostriatal synapses. Furthermore, LTP induced by Roscovitine is modulated by the activation of dopamine and NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartate) receptors, PKA and L-type Ca (calcium) channels. It also demonstrated that plasticity induced by Roscovitine has a presynaptic and a postsynaptic component.

## MATERIALS AND METHODS

All experiments were carried out with the Institutional approval in accordance with the Mexican (NOM-062-ZOO-1999), Institutional (FES-I, UNAM, Ethics committee) and NIH regulations for the care and use of experimental animals (8<sup>th</sup> Edition, Library of Congress, 2010940400).

### Animals

The mice used in this study were male C57BL/6 mice (Harlan, Inc., México) aged 4–5 weeks. They were housed in plastic cages, in groups of 5–6, in a room at 25°C with a 12/12 light-dark cycle, with free access to food and water.

### Electrophysiology

Electrophysiological experiments were performed on sagittal brain slices (300 µm) obtained as follow: animals were anesthetized (halothane) in an anesthesia chamber and were then decapitated. The brains were quickly removed and brain slices containing the dorsal striatum were cut using a vibrating microtome (1000 Plus Pelco vibratome; Ted Pella, INC.), in an immersed cold (4°C) low Ca<sup>2+</sup> saline solution with the following composition (in mM): 130 NaCl, 2 KCl, 5 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub> and 10 glucose saturated with 95% (v/v) O<sub>2</sub> and 5% (v/v) CO<sub>2</sub> (298 mOsm/l, pH = 7.4). After 1 h of recovery, slices used for field potential recordings were transferred to a submerge chamber and superfused with ACSF (artificial cerebrospinal fluid) at 34°C. The ACSF composition was (in mM): 125 NaCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 3 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucose, 0.2 Thiourea, and 0.20 ascorbic acid, gassed with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> (298–300 mOsm/l, pH = 7.4).

Extracellular field recordings were performed in striatal cells by eliciting field excitatory postsynaptic synaptic spikes (population spikes) using a sharp (pencil-shaped), concentric, bipolar, tungsten-stimulating electrode (12 µm at the tip; FHC) attached to an isolation unit (DS2A, Digmiliter LTD). The stimulating electrode was placed at the corpus callosum. The recording electrode was a borosilicate glass electrode (~5 MΩ resistance), containing NaCl (3M), and placed in the dorsal striatum, ~500 µm away from the stimulating elec-

trode. A population spikes slope of 50% of the maximum was used for baseline. After 10 min of stable baseline, three trains of 3s, 100 Hz (tetanus) with intervals of 20 s were delivered. All experiments were recorded for at least for 30 min after HFS.

Slices used for whole cell recordings were transferred to a saline solution containing (in mM): 130 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 10 glucose saturated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (298 mOsm/l; pH = 7.4; 25–27°C). After 1 h of equilibration, single slices were shifted to a recording chamber that was continuously superfused with oxygenated saline (1–3 ml/min). Whole cell recordings were performed using an Infrared differential interference contrast upright microscope (BX51WI, Olympus) coupled to a CCD (charge-coupled-device) camera. After field stimulation (as described above), EPSC (excitatory postsynaptic currents) were recorded in MSN through an Axopatch 200B amplifier (Axon, Molecular Devices), digitalized with the aid of a Digidata 1322A (Axon, Molecular Devices) and acquired through pClamp 9.1 software. Series resistance was compensated (80%). Input and access resistance were continuously monitored during the experiment by evoking a transmembrane current with a voltage command. Criteria for accepting recordings were an access resistance below 30 MΩ and no changes throughout all experiments. Patch micropipettes (3–6 MΩ) were pulled (Sutter Instruments, Inc.) from borosilicate glass tubes (1.5 mm OD, WP) and were filled with internal saline containing (in mM): 72 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 36 KCl, 1.1 EGTA, 10 Hepes, 2CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP-Mg<sub>2</sub>, 0.3 GTP-Na and 5 DM-314 (272–275 mOsm/l; pH 7.3). All experiments were carried out in the presence of Bicuculline (10 µM) to block the GABAergic component. To evaluate the effects of Cdk5 inhibition, Roscovitine (20 µM) was added to the bath. Experiments designed to evaluate Cdk5 and signaling pathways were carried out in the presence of D1 and D2 receptor agonists and antagonists applied in the bath. To explore whether Cdk5 inhibition affects plasticity in both types of MSN D1-BAC mice were used, cells that did not exhibit fluorescence were assumed to be D2 expressing MSN. Finally, to identify if Cdk5 effects were mediated through an action on NMDA receptors or L-type Ca channels, some experiments were performed in the presence of AP5 (50 µM) or Nifedipine (5 µM), respectively. Data analyses were performed off-line with the aid of clampfit (Axon, Molecular Devices) and Microcal Origin (Origin Lab Corporation) software.

### Image acquisition

Fluorescent images were obtained using the upright microscope (BX51WI, Olympus) with a 20× objective magnification (Olympus X Lum PlanFl 20X/0.95W) coupled to a Hamamatsu (Orca C4742-95) camera, and acquired with the Olympus image acquisition system Cell M<sup>®</sup>, which sent excitation light in the range 450–490 nm through a dichroic filter (495 nm); emission was 502–538 nm.

### Western blot

To evaluate the phosphorylation state of DARPP-32 in our experimental conditions, striatal slices were incubated with Roscovitine 20  $\mu$ M or vehicle for 10 min in artificial brain fluid. After incubation, striatal tissue was homogenized in lysis buffer containing 26 mM Tris-HCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1.3 M glycerol and 130 mM NaCl, with the protein phosphatase inhibitor cocktail Complete mini tab (Roche). The samples were recollected and centrifuged for 5 min at 4500 rpm; supernatants were recollected and store at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Protein quantification was made using the Bradford method and 80  $\mu$ g of protein was loaded in 10% (w/v) PAGE for electrophoresis. Proteins were transferred to PVDF membranes and incubated with primary antibodies against pDARPP-32 Trh<sup>24</sup> (1:1000), pDARPP-32 Trh<sup>25</sup> (1:1000) and Actin (1:1000) for 12–20 h at 4 $^{\circ}\text{C}$ , and with secondary antibodies (1:2000) with HRP for 2 h at room temperature. Protein detection was performed through the use of luminol with a chemiluminescence method (Millipore); Images were acquired via a scan (HP Scanjet G2410) and analyzed with Image J software for the evaluation of densitometry.

### Reagents

All reagent were purchased from Sigma-Aldrich, except; antibodies, anti pDARPP-32 Trh<sup>24</sup>, anti pDARPP-32 Trh<sup>25</sup> (Millipore) and anti Actin (Santa Cruz); and NaCl, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> from JT Backer.

### Statistical analysis

Data were analyzed with the statistical software Sigma Plot (Systat Software, Inc.) and plotted using Microcal Origin 7 (Microcal Origin Lab Corporation) and Adobe Illustrator 10 or Adobe<sup>®</sup> Creative Suite<sup>®</sup> 5 (Adobe Systems, Inc.). Statistical analysis was conducted with a parametric test or a non-parametric test if data did not display normal distribution. Data were considered statistically significant if  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Plasticity of glutamatergic synapses

HFS of the corticostriatal pathway produced both striatal LTD and LTP, as previously reported (Figures 1A and 1B), the percentage of experiments in which population spikes exhibited LTD after HFS was 62.5%, whereas LTP was observed in 37.5% of the recordings (Figure 1C). LTD observed in corticostriatal synapses was statistically significant ( $t_2 = 6.458$ ,  $P = 0.000117$ ,  $t$  test). The LTP observed in the 37.5% of the cases was also statistically significant compared to pre HFS ( $t_2 = -7.013$ ;  $P = 0.00094$ ,  $t$  test, Figure 1D). Analysis of

PPR (pair pulse ratio) of LTP or LTD was not statistically significant before and after HFS ( $t_2 = 1.874$ ,  $P = 0.0977$  and  $t_2 = 2.22$   $P = 0.0769$ , paired  $t$  test, LTD and LTP, respectively).

Comparisons of LTD with LTP obtained after HFS displayed statistical differences between ( $t_{14} = 7.402$ ,  $P < 0.0001$ ,  $t$  test, Figure 1D).

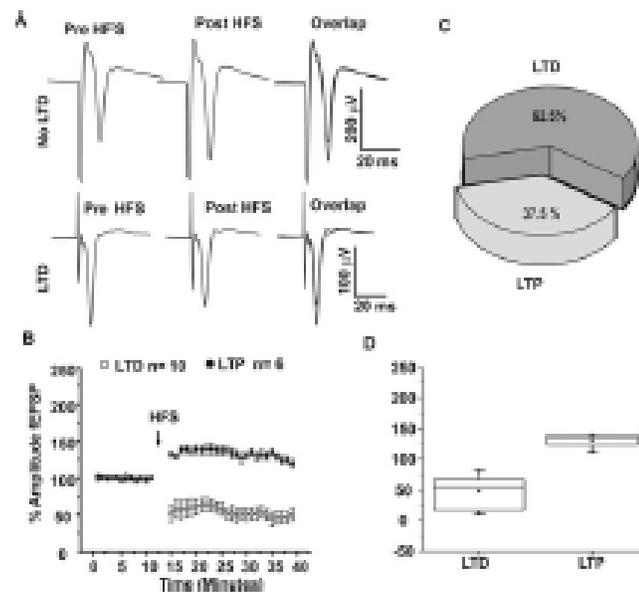
### Cdk5 inhibition produces an increase in glutamatergic population spikes and favors LTP induction after HFS protocol

We first sought to explore whether Roscovitine had a modulatory role in corticostriatal communication. Bath application of the Roscovitine (20  $\mu$ M), significantly increased the amplitude of striatal glutamatergic population spikes in comparison to baseline ( $213.57 \pm 21.91$  versus  $99.99 \pm 0.005\%$ , respectively;  $t_2 = -5.18$ ;  $P = 0.002$ , Figures 2A–2C). The analysis of PPR after bath application of Roscovitine ( $1.057 \pm 0.139$ ), was significantly different ( $t_2 = 10.300$ ,  $P = 0.00195$ ,  $t$  test) to baseline ( $1.794 \pm 0.166$ ), suggesting that Cdk5 inhibition modulates glutamatergic transmission through presynaptic mechanisms.

As the administration of Roscovitine alone generated an increase in the population spikes amplitude, we wondered whether Roscovitine might modulate the induction of striatal plasticity, then, HFS experiments were carried out in the presence of the Cdk5 inhibitor, Roscovitine. The percentage of cells that exhibit LTD and LTP with the HFS (100 Hz) protocol changed when Cdk5 was inhibited (Figures 2D and 2E), favoring LTP induction in 50% of experiments, while LTD induction was reduced 12.5% in comparison with control conditions. Then, in the presence of the Cdk5 inhibitor, 50% of the experiments displayed LTP and 50% of the experiments exhibited LTD. This suggests that Cdk5 activity in striatal MSNs is, in part, responsible for LTD generation after HFS.

### LTP induction in the presence of Roscovitine displays higher amplitude population spikes

To further analyze LTP induction in the presence of Roscovitine, we compared LTP induced in control conditions with LTP induced in the presence of Roscovitine. Population spikes increment produced by HFS in the presence of Roscovitine was  $64.864 \pm 6.598\%$  compared to baseline (Figure 3B) these increment was statistically significant ( $t_2 = 10.15$   $P = 0.0005$ , paired  $t$  test). When we compare LTP in the presence of Roscovitine against LTP produced in control conditions (without Roscovitine), we found that LTP magnitude in presence of Roscovitine significantly increased in amplitude, in comparison to control conditions (Figures 3B and 3C) (LTP in control,  $131.544 \pm 4.643\%$  versus LTP in Roscovitine,  $164.864 \pm 6.598\%$ ;  $t_2 = 4.158$ ,  $P = 0.0025$ ,  $t$  test, Figures 3B and 3C). The analysis of the PPR before versus after HFS in



**Figure 1** Plasticity of corticostriatal synapses. (A) Population spikes traces show amplitude increase (LTP) or decrease (LTD) after HFS (three trains, 2 s, 100 Hz) of corticostriatal synapses. Population spikes overlaid are magnified in the squares to illustrate population spikes before (black) and after (gray) HFS. (B) Temporal course of population spikes amplitude before and after HFS of corticostriatal synapses. Population spikes are normalized to 100% amplitude in control as a reference through all experimental conditions. (C) In control conditions, 62.5% of population spikes exhibited LTD and 37.5% displayed LTP. (D) Box plots illustrate the distribution of experiments where LTD or LTP was induced in comparison to control which was normalized to 100%. \* $P < 0.0001$ .

control conditions was not different ( $t_1 = 2.222$ ,  $P = 0.077$ ,  $t$  test, Figures 3D and 3F); on the contrary, PFR analysis in the presence of Roscovitine was statistically different ( $t_1 = 6.010$ ,  $P = 0.00386$ ,  $t$  test), suggesting that amplitude increase after HFS in the presence of Roscovitine may have a presynaptic origin (Figures 3E and 3F).

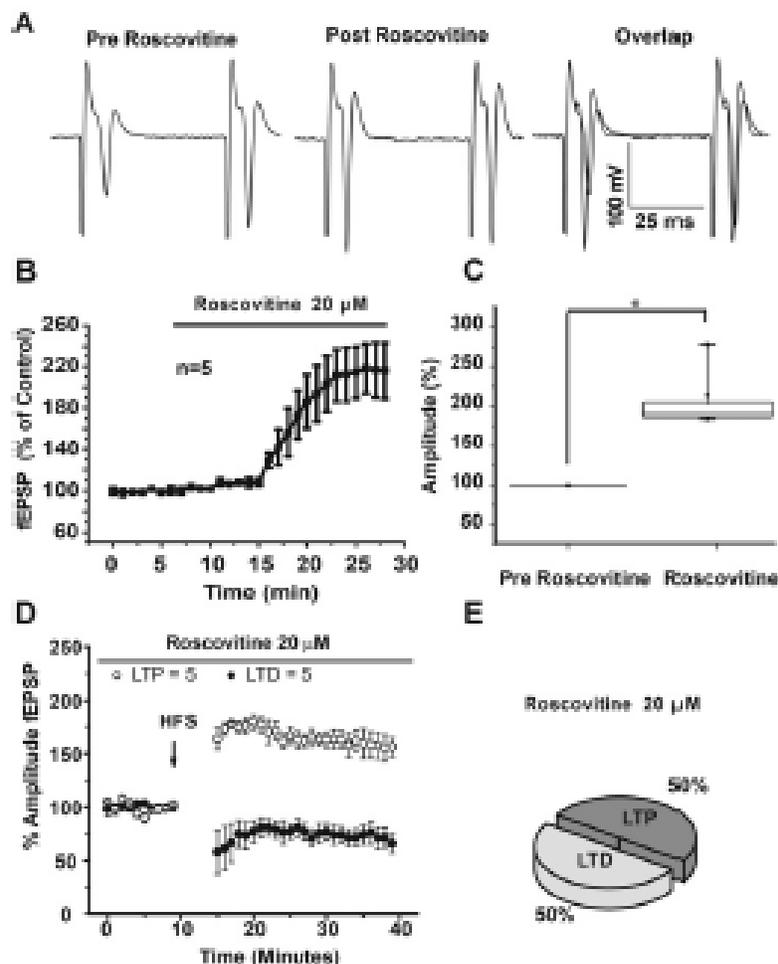
**LTP induction in the presence of Roscovitine is prevented in the presence of D1 and D2 antagonists**

Previous experiments have shown that Cdk5 inhibits the PKA signaling pathway through DARPP-32 Thr<sup>75</sup> phosphorylation (Bibb et al., 1999); therefore, since DARPP-32 plays an important role in DA signaling, we hypothesized that the underlying mechanism of LTP induction after Cdk5 inhibition might also involve DA receptor activation. As a result, we evaluated the role of D1 and D2 receptors in the population spikes increase with the co-application of specific antagonists for these receptors. Co-administration of Roscovitine (20  $\mu$ M) and the D1 antagonist SCH 23390 (1  $\mu$ M) blocked the LTP induction seen in the presence of Roscovitine alone ( $t_0 = 7.562$ ,  $P < 0.0001$ ,  $t$  test; Figures 4B–4D). In the presence of Roscovitine (20  $\mu$ M) and the D2 antago-

nist Sulpiride (1  $\mu$ M), the amplitude increase of population spikes induced with an HFS protocol was also significantly reduced ( $t_1 = 4.076$ ,  $P = 0.0036$ ,  $t$  test; Figures 4 (4C–4D)). Analysis of PFR showed no statistical change between groups ( $t_1 = 4.270$ ,  $P = 0.012$  and  $t_1 = 1.456$ ,  $P = 0.219$ , paired  $t$  test for sulpiride and SCH23390, respectively), suggesting a postsynaptic effect of DA receptor inhibition in Roscovitine LTP induction (Figures 4E–4G).

**The PKA inhibitor H-89 blocked LTP induction with Roscovitine**

To evaluate whether PKA activation was necessary to induce LTP observed in the presence of Roscovitine, experiments were carried out in the presence of the PKA inhibitor H-89. Bath applied H-89 (5  $\mu$ M) significantly prevented LTP induction in the presence of Roscovitine ( $t_1 = 8.058$ ,  $P = 0.0001$ ,  $t$  test, Figure 5). This data indicates that the PKA pathway is involved in LTP induction when Cdk5 is inhibited. The analysis of PFR before and after HFS in the presence H-89 + Roscovitine suggested that this effect was postsynaptically mediated ( $t_1 = 1.456$ ;  $P = 0.219$ ,  $t$  test, Figures 5D and 5E).



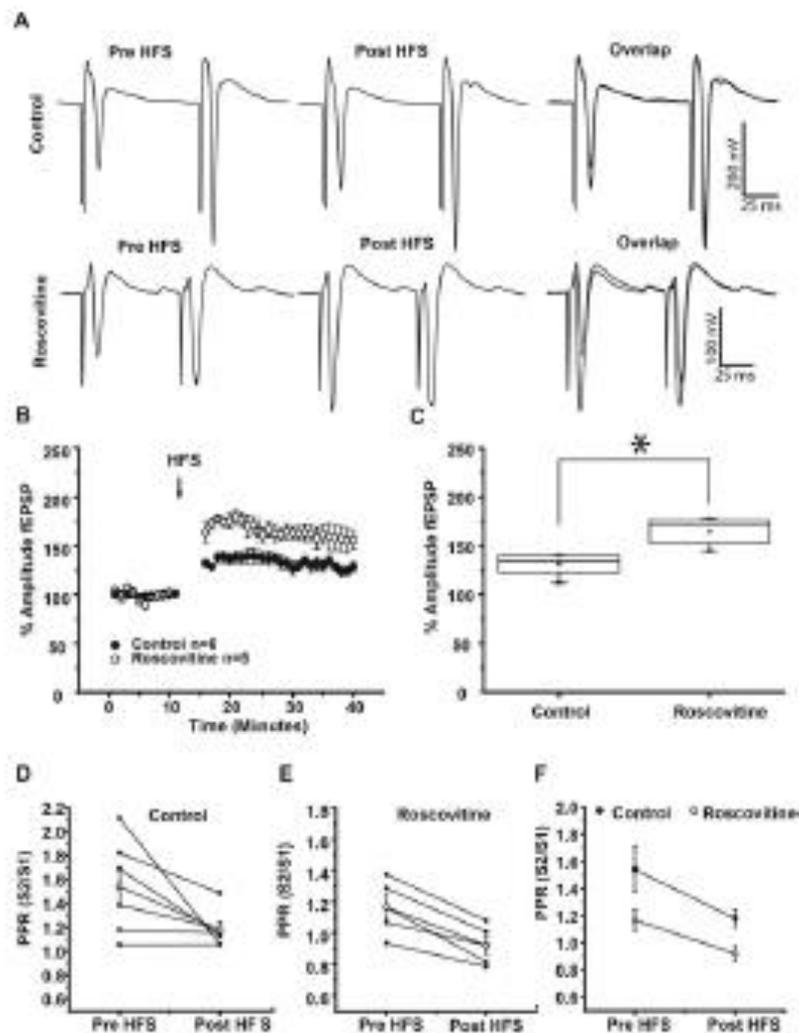
**Figure 2** Roscovitine increases population spiken amplitude and facilitates the induction of LTP in glutamatergic corticostriatal synapses. (A) Representative population spiken traces in control, in the presence of Roscovitine 20  $\mu$ M, and the overlap of both conditions. (B) Temporal course of population spiken amplitude increase after both application of Roscovitine (20  $\mu$ M). (C) Box plot showing population spiken amplitude statistical changes in the presence of Roscovitine 20  $\mu$ M. (D) Temporal course of field potential amplitudes before and after HFS. (E) Note that, in the presence of a Cdk5 inhibitor, there was an increase in the percentage of population spiken that exhibited LTP and a reduction in the population spiken that exhibited LTD in the presence of 20  $\mu$ M Roscovitine. \* $P < 0.002$ .

H-89 is a potent PKA inhibitor, yet still exhibits a moderate inhibitory effect on other protein kinases (Meja et al., 2004); in order to better evaluate whether Cdk5 inhibition in slices modifies the phosphorylation state of DARPP-32, Western blot analysis was performed in striatal slices incubated with 20  $\mu$ M Roscovitine. Phosphorylation of DARPP-32 at the residue Thr<sup>24</sup> was greatly increased in the presence of Roscovitine (2.12-fold compare to control) ( $t_6 = 3.337$ ;  $P = 0.0157$ ,  $t$  test, Figure 6A), whereas DARPP-32 Thr<sup>75</sup> exhibited a significant reduction of 61% ( $t_4 = 4.137$ ;  $P = 0.0144$ ,  $t$  test,

Figure 6B) with the Cdk5 inhibitor, showing that DARPP-32 was less phosphorylated at Thr<sup>75</sup> by Cdk5, leaving the PKA pathway active.

#### NMDA and L-type Ca channel role in Roscovitine LTP induction

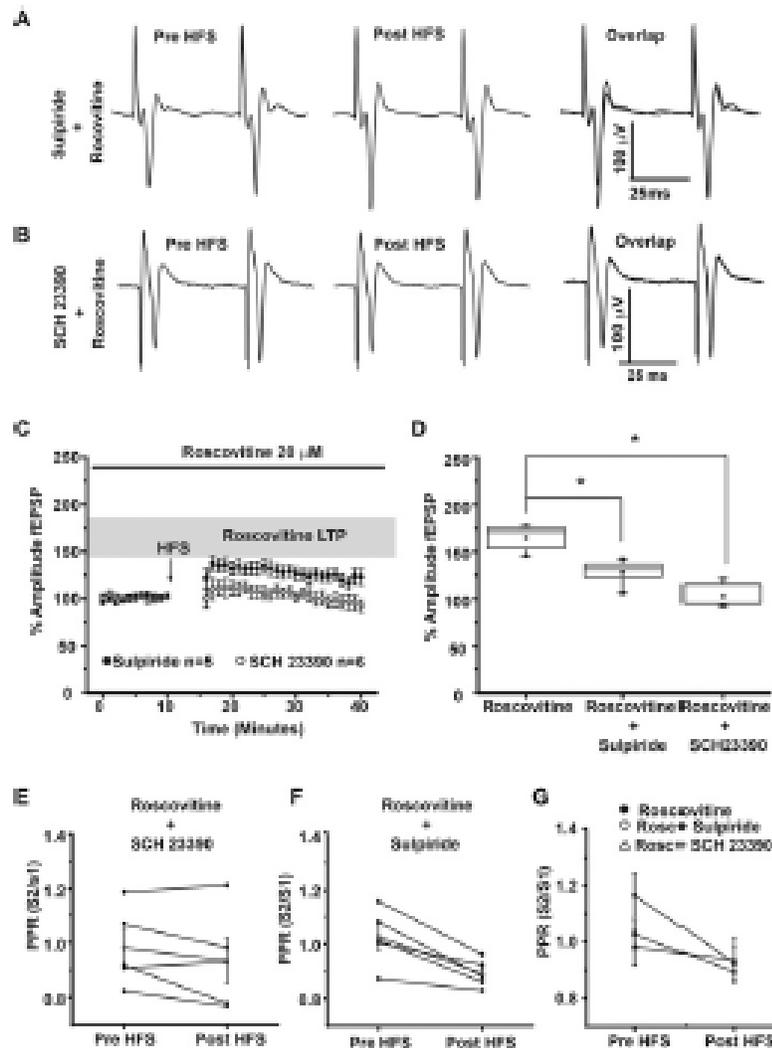
Some of the cellular targets of PKA are NMDA and L-type Ca channels. To evaluate if Ca that enters through NMDA receptors and L-type Ca channels participates in Roscovitine LTP



**Figure 3** Population spikes amplitude increase in Roscovitine-induced LTP is greater than in control LTP. [A] Up—Representative population spikes traces before HFS, after HFS and the overlap in control conditions (population spikes increased  $31.544 \pm 4.642\%$  after HFS). Down—Representative population spikes traces before HFS, after HFS and the overlap in the presence of  $20 \mu\text{M}$  Roscovitine. (Population spikes increased  $64.864 \pm 6.526\%$  after HFS in the presence of Roscovitine.) [B] Temporal course of population spikes amplitude increase before and after HFS (100 Hz, three trains, 2 s). Note the difference in LTP amplitude induced in control and that induced with Roscovitine ( $20 \mu\text{M}$ ). [C] Box plot shows that population spikes amplitude increase in the presence of Roscovitine is statistically different from that of the control. [D–F] Illustrates PPR in control, in the presence of Roscovitine and the average of both experimental conditions. \* $P < 0.02$ .

induction, NMDA receptors were blocked with AP5 ( $50 \mu\text{M}$ ) in some experiments and L-type Ca channels were blocked with Nifedipine ( $10 \mu\text{M}$ ) in other experiments; in both cases, population spikes was significantly reduced. AP5 significantly reduces LTP induced in the presence of Roscovitine ( $t_4 = 5.142$ ,  $P = 0.0009$ , *t* test; Figures 7A, 7C and 7D) and Nifedipine

abolished population spikes increase ( $t_4 = 8.247$ ,  $P < 0.0001$ , *t* test; Figures 7B–7D). PPR analysis indicates that AP5 may have its effect at the presynaptic site ( $t_4 = 2.76$ ;  $P = 0.05$ , *t* test, Figures 7E and 7G), whereas Nifedipine may have a postsynaptic effect ( $t_4 = 1.456$ ;  $P = 0.219$ , *t* test, Figures 7F and 7G).

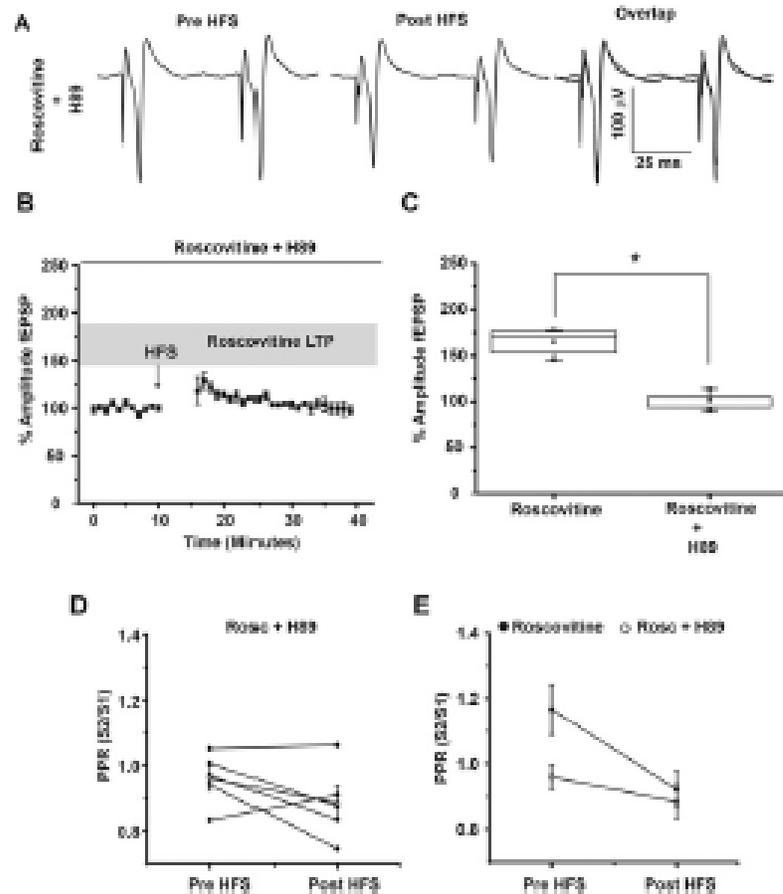


**Figure 4** LTP induced with Roscovitine is prevented in the presence of D1 and D2 antagonists. (A) Representative population spikes traces before and after HFS in the presence of 20  $\mu$ M Roscovitine + 1  $\mu$ M Sulpiride. The overlap of traces shows that D2 antagonists prevented the amplitude increase in the population spikes triggered by HFS. (B) Representative population spikes traces before HFS and after HFS in the presence of 20  $\mu$ M Roscovitine + 1  $\mu$ M SCH 23390. The overlap of traces shows that D1 antagonists prevented the amplitude increase in the population spikes triggered by HFS. (C) The temporal course of the population spikes amplitude increase after HFS, gray area shows LTP induced by Roscovitine (20  $\mu$ M), open circles and closed circles shows population spikes in the presence of 20  $\mu$ M Roscovitine + 1  $\mu$ M SCH 23390 and 20  $\mu$ M Roscovitine + 1  $\mu$ M Sulpiride, respectively. (D) Box plot shows that the population spikes amplitude increase triggered by Roscovitine was prevented by D1 and D2 antagonists. (E–G) Illustrates PPR in the presence of 20  $\mu$ M Roscovitine + 1  $\mu$ M SCH 23390, 20  $\mu$ M Roscovitine + 1  $\mu$ M Sulpiride and the average of all experimental conditions. \* $P$  = 0.004.

### Whole cell patch clamp recordings produced LTD in both D1- and D2-expressing cells

To evaluate whether all MSN are modulated by *CaMK5*, whole cell patch clamp recordings were carried out in D1-BAC

mice. MSN that did not exhibit fluorescent emission were assumed to be D2-expressing neurons. Figure 8 illustrates that HFS produced LTD in most of the cells recorded, and the LTD produced was statistically significant (D1:  $t_4 = 3.847$ ;  $P = 0.0184$ ,  $t$  test; D2:  $t_5 = -2.648$ ,  $P = 0.0455$ ,  $t$  test;



**Figure 5** H-89 blocked LTP induction with Roscovitine

(A) Representative population spikes traces before HFS and after HFS in the presence of Roscovitine (20  $\mu$ M) + H-89 (5  $\mu$ M). Population spikes traces overlap shows that H89 completely blocked any amplitude change. (B) Temporal course of population spikes amplitude increase after HFS (100 Hz) in the presence of 20  $\mu$ M Roscovitine + 5  $\mu$ M H-89. (C) Box plot shows that population spikes amplitude increase triggered by Roscovitine was prevented by the PKA inhibitor H-89. (D–E) Illustrates PPR in the presence of Roscovitine + H-89 and the average of both experimental conditions (Roscovitine, Roscovitine + H-89). \* $P < 0.05$ .

Figures 8B and 8C, respectively). The vehicle used to dissolve Roscovitine did not affect this plasticity (Figure 8A).

#### Switching off Cdk5 from the recording bath generates LTP in corticostriatal synapses of individual cells

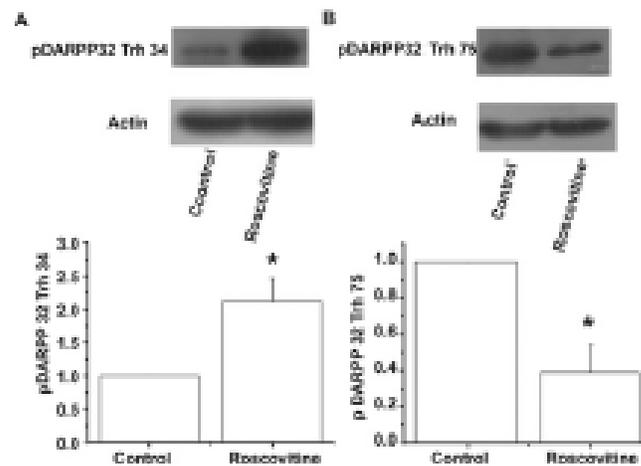
When Roscovitine was added to the bath in whole cell recordings, HFS elicited only LTP (Pre-HFS  $99.656 \pm 0.468\%$ , versus post-HFS  $138.107 \pm 12.421\%$ ;  $t_0 = 3.066$ ;  $P = 0.0279$ , *t* test). Comparison of PPR before and after HFS was not significant in control conditions or in the presence of Roscovitine (Figure 9C), suggestive of postsynaptic changes after HFS. Time constant analysis of control or Roscovitine

did not show changes before or after HFS; however, when the time constant of EPSC of the control was compared to EPSC in the presence of Roscovitine before ( $t_0 = 2.544$ ,  $P = 0.0315$ , *t* test) or after HFS, it showed a significant difference ( $t_0 = 2.945$ ,  $P = 0.0164$ , *t* test, Figure 9D).

Decay constants were not different between control pre- and post-HFS, nor between Roscovitine pre- and post-HFS or between groups both pre- and post-HFS (Figure 9E).

#### Roscovitine facilitation of LTP has a presynaptic and postsynaptic component

Nonetheless PPR and time constant measurements in whole cell recordings suggested a postsynaptic component of



**Figure 6** Western blots of pDARPP-32 obtained in striatal slices treated with Roscovitine. The figure shows the bidirectional regulation of pDARPP-32 in the presence of Roscovitine. (A) In the presence of 20  $\mu$ M Roscovitine, DARPP-32 Thr<sup>34</sup> phosphorylation significantly increased compared to the control (2.12-fold compared to control). (B) In the presence of 20  $\mu$ M Roscovitine, DARPP-32 Thr<sup>75</sup> decreased 61% compared to the control. pDARPP-32 immunoblot levels were densitometrically scanned and represented as mean densitification density of actin and expressed in arbitrary units (A.U.). Blots of pDARPP-32 Thr<sup>34</sup> (1:1000), pDARPP-32 Thr<sup>75</sup> (1:1000) and Actin (1:1000) are representative of at least three independent experiments of three mice brains each. \* $P < 0.05$ .

Roscovitine LTP; it is known PPR is not a total convincing protocol to evaluate presynaptic effects when a postsynaptic component is involved. To test if there was a presynaptic and postsynaptic component in LTP induction after Cdk5 inhibition, two series of experiments were carried out. In the first series of experiments, whole cell recordings were made in the presence of Roscovitine in the recording pipette to inhibit Cdk5 activity in the postsynaptic cell. In this conditions, HFS induced LTD similar to control conditions (control  $61.78 \pm 9.36\%$  versus intracellular Roscovitine  $67.06 \pm 6.92\%$ ,  $t_0 = 0.4535$   $P = 0.6622$ ,  $t$  test), this data illustrated that Cdk5 has to be inhibited in the presynaptic site to induce LTP. In the second series of experiments, Roscovitine was added in the recording bath to inhibit Cdk5 at the presynaptic site and the PKA inhibitor H89 was in the recording pipette to inhibit PKA pathway in the postsynaptic cell. In this conditions, HFS did not induce long-term plasticity (pre-HFS =  $98.18412 \pm 1.192$  versus post-HFS =  $84.247 \pm 8.01$ ,  $t_0 = 1.628$   $P = 0.1644$ ,  $t$  test), showing that the PKA signaling pathway is associated with the postsynaptic component of Roscovitine-induced LTP (Figure 10).

## DISCUSSION

The molecular process underlying synaptic plasticity in the striatum has not been fully elucidated; in this paper, we

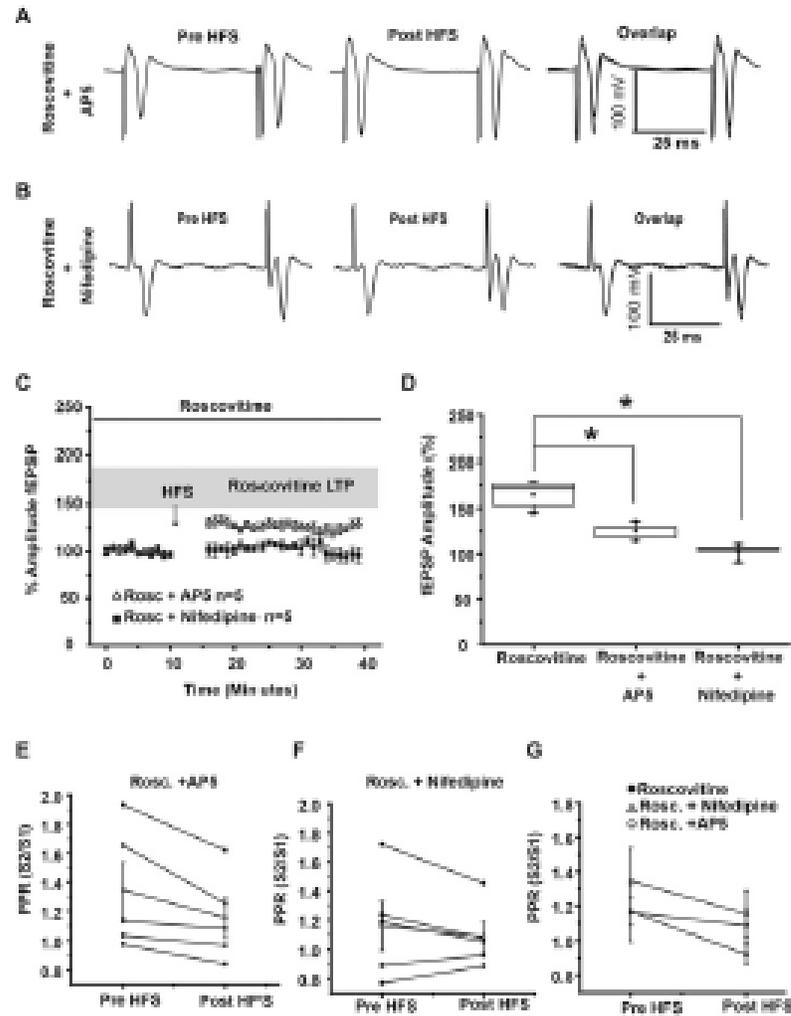
evaluated the modulatory role of Cdk5 on corticostriatal synaptic plasticity. Our results show that the inhibition of Cdk5 with the inhibitor Roscovitine favors the striatal excitability of population spikes and facilitates LTP induction of glutamatergic transmission.

### HFS of corticostriatal synapses, produced both LTD and LTP

LTD is the most frequent type of striatal plasticity however, as previously reported we obtained LTD mostly, but also LTP with the same stimulation protocol. It has been shown that back propagate action potentials into the higher-order dendrites of striatal neurons during cortically driven 'up', together with spike-timing relative to cortical excitatory inputs can induce and determine the direction of synaptic plasticity at corticostriatal synapses (Pawlak and Kerr, 2008). Then depending on the activity history together with intracellular signals of a neuron, one form of plasticity or another will be induced. This study evaluated how striatal plasticity can be modified by Cdk5 signaling pathway.

### Cdk5 modulates glutamate release in corticostriatal synapses

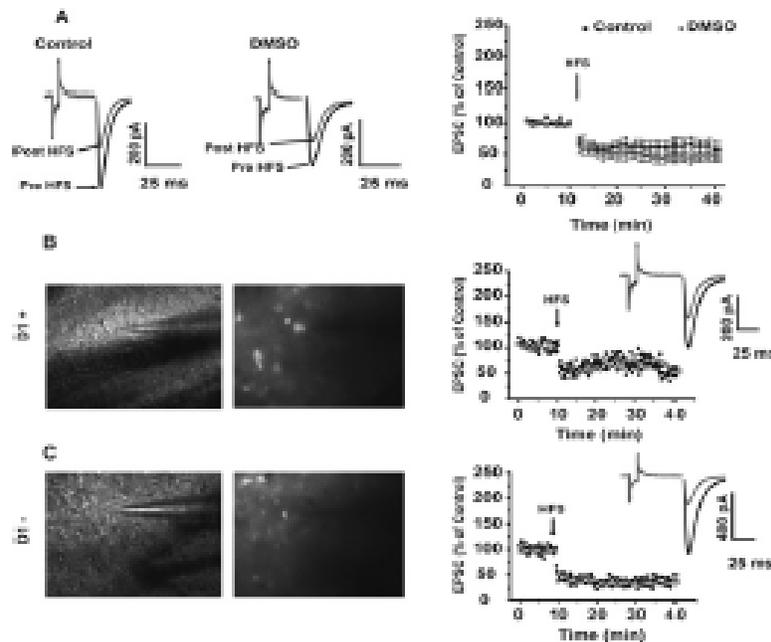
Cdk5 inhibition with Roscovitine increased the amplitude of the excitatory population spike. It was previously reported that Cdk5 inhibition increases NMDA-activated currents (Chergui et al., 2004); however in our experimental



**Figure 7** LTP induced with 20  $\mu\text{M}$  Roscovitine is prevented in the presence of the NMDA receptor antagonist AP5 (30  $\mu\text{M}$ ) or L-type calcium blocker Nifedipine (10  $\mu\text{M}$ )  
 (A) Representative traces of population spikes in the presence of 30  $\mu\text{M}$  AP5. AP5 reduced Roscovitine-LTP induction. (B) Representative traces of population spikes in the presence of 30  $\mu\text{M}$  Roscovitine + 10  $\mu\text{M}$  Nifedipine. Nifedipine blocked Roscovitine-LTP induction. (C) Temporal course of population spikes in the presence of Roscovitine, Roscovitine + AP5 and Roscovitine + Nifedipine. (D) Box plot shows that population spikes amplitude increase triggered by Roscovitine was reduced significantly in the presence of AP5 or Nifedipine. (E-G) PPR in the presence of Roscovitine + AP5, Roscovitine + Nifedipine is shown. (H) PPR analysis of the experimental conditions. \* $P < 0.001$ .

conditions, population spikes were recorded and mediated mainly by AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid)/KA (kainate) activation. In fact  $\text{Mg}^{2+}$  was always present in the extracellular media. The reduction in the spike PPR in the presence of Roscovitine indicated that, the amplitude increase of the population spike had a presynaptic component. Cdk5 activity reduces glutamate release through different mechanism. For example, the inhibition of

Cdk5 increases neurotransmitter release by modulating fusion pore (Barclay et al., 2004), mobilizing the storage pool (Kim and Ryan, 2010) or by modulating N and P/Q Ca channels (Tomizawa et al., 2002; Su et al., 2012). In the striatum, glutamate release from corticostriatal terminals is controlled by N and P/Q Ca channels (Bargas et al., 1998); and, these channels could be a phosphorylation target of Cdk5 in corticostriatal terminals.



**Figure 8** LTD was induced in D1+ and D1- medium spiny cells. (A) DMGO did not affect MSN plasticity. (B) D1+ cells exhibited LTD after HFS. (C) D1- cells also exhibited LTD after HFS. In (B) and (C) the microphotography on the left was taken without GFP filter and with filter for GFP on the right photo. Inserts show LTD after HFS.

### Cdk5 activity is involved in striatal plasticity

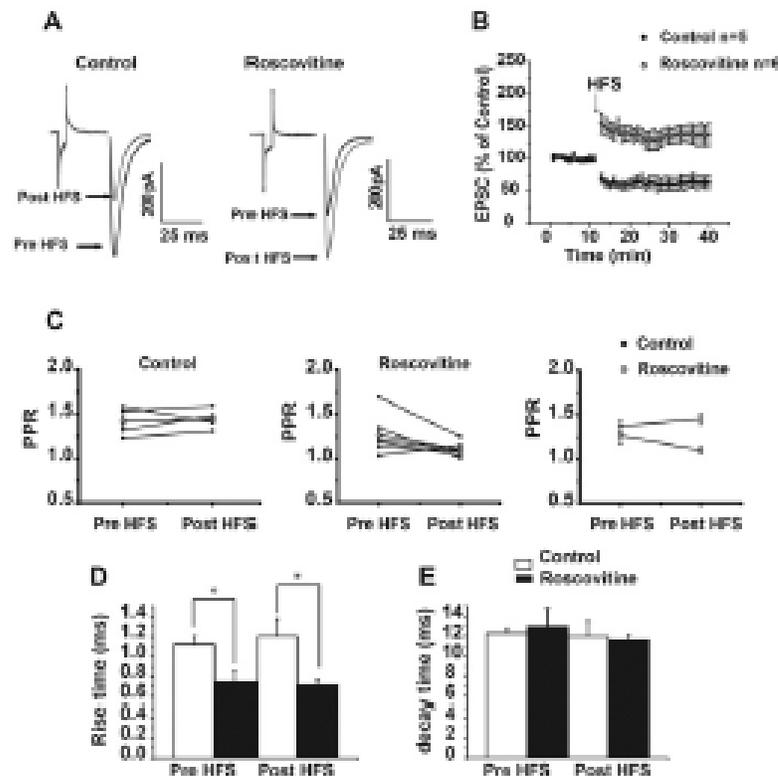
Our results show that Cdk5 activity is important for LTD induction because Cdk5 inhibition turned LTD into LTP. What is more, the corticostriatal LTP produced with HFS when Cdk5 is inhibited with Roscovitine was greater in magnitude than the corticostriatal LTP that is occasionally obtained in control slices. Cdk5 is important for the induction of LTD (Ohshima et al., 2005) and LTP (Li et al., 2001) in the hippocampus; furthermore, in conditional Cdk5 mice there is an LTP increase (Hawasi et al., 2007); however, there were any reports that demonstrated that Cdk5 inhibition favored striatal LTP and its activity participated in corticostriatal LTD.

### LTP induced by Cdk5 inhibition is modulated by dopamine

Owing to Cdk5 inhibition favored striatal LTP induction, signaling pathways modulated by Cdk5 should participate in corticostriatal plasticity. DARPP-32 is target of Cdk5 as well as PKA, and activation of the PKA signaling pathway increases NMDA currents (Flores-Hernández et al., 2002) then, it is possible that PKA activation favored striatal LTP, while the activation of Cdk5 maintained LTD. Our results indicated that striatal LTP induced by the inhibition of Cdk5 with Roscovitine

involved the D1 signaling pathway because, in the presence of the D1 antagonist SCH23390 or the PKA inhibitor H-89, Roscovitine LTP induction was no longer generated in corticostriatal synapses even using the HFS protocol. Interestingly, the blockage of LTP by D1 inhibitors did not re-establish LTD, which suggested that Cdk5 may modulate LTD by means of an independent mechanism from that which LTP is modulated.

Besides D1 involvement in striatal LTP, we found that the D2 receptor antagonist Sulpiride diminished the magnitude of LTP induced by Roscovitine. D2 activation has been related to the generation of striatal LTD (Centonze et al., 2001; Lovinger, 2010); nevertheless, the D2 signaling pathway can stimulate PKC in medium spiny cells (Summeier et al., 2007), which has been associated with striatal LTP (Gubellini et al., 2004). Moreover, D2 activation results in changes to the phosphorylation state of both Thr<sup>75</sup> and Thr<sup>24</sup> residues of DARPP-32 (Nishi et al., 1998b), which are the targets of Cdk5 and PKA, respectively. However, we are not ruling out that other protein kinases or phosphatases participate in LTP induction by Cdk5 inhibition. For example, D2 stimulation activates the PP-2B (protein phosphatase 2B), also known as calcineurin, which in turn modulates PKA/DARPP-32 pathways (Greengard et al., 1999). Therefore an indirect action of D2 on PKA signaling cannot be ignored in corticostriatal LTP.



**Figure 3** Switching off Cdk5 moves LTD to LTP in individual MSNs

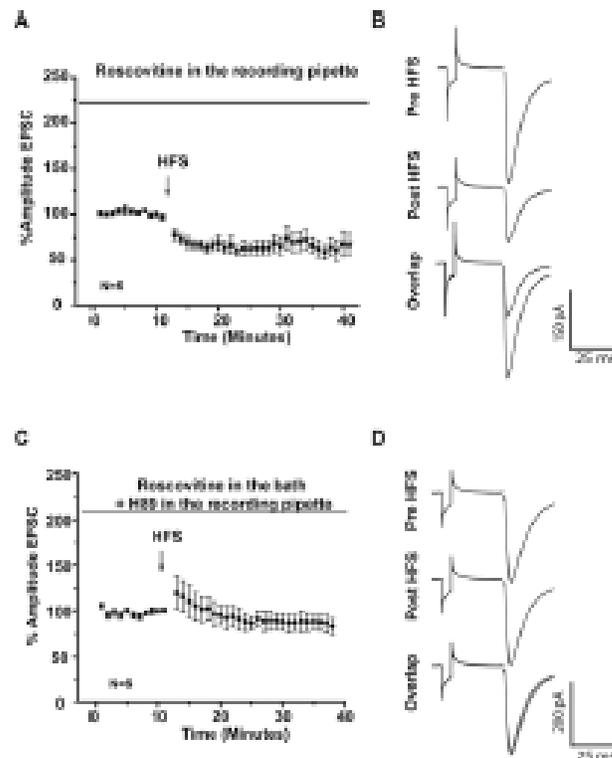
(A) Representative traces of EPSC in control and in the presence of 20  $\mu$ M Roscovitine in the bath. The excitatory current decreased in amplitude after HFS, and increased in amplitude after HFS if Roscovitine was present in the recording bath. (B) Temporal course of EPSC after HFS in control conditions and in the presence of Roscovitine. (C) PPR did not change in control or in the presence of Roscovitine. (D) Illustrates the rise time of EPSC in the control compared to Cdk5 block. Rise time pre- and post-HFS significantly changed between groups. (E) Illustrates decay time EPSC in control compared to when Cdk5 was blocked. No changes were found between groups.  $^*p < 0.05$ .

### Cdk5 modulates striatal plasticity through the phosphorylation of Thr<sup>75</sup> residue of DARPP-32

Phosphorylation of DARPP-32 at the Thr<sup>75</sup> residue (Bibb et al., 1999; Chergul et al., 2004), converts DARPP-32 into a potent inhibitor of PKA (Bibb et al., 1999); this action stops the cellular effects produced by D1 receptor activation. However, if Cdk5 is inhibited, the D1 signaling pathway should prolong PKA activity. We tested this idea by analyzing pDARPP-32 Thr<sup>24</sup> and pDARPP-32 Thr<sup>75</sup>. In the presence of Roscovitine, Thr<sup>24</sup> residue increased while Thr<sup>75</sup> residue reduced, providing evidence that the inhibition of Cdk5 favors the phosphorylation state of DARPP-32 Thr<sup>24</sup> which may be responsible for LTP induction in the present report. This information is also supported by data obtained from experiments where D1 receptor and PKA activity were blocked in the presence of Roscovitine and LTP induction was prevented in corticostriatal synapses.

### L-type channels and NMDA receptors are involved in Roscovitine LTP induction

The inhibition of L-type Ca channels or NMDA receptors with Nifedipine and AP5, prevented or reduced respectively Roscovitine LTP induction, demonstrating that Ca<sup>2+</sup> influx through L-type channels and NMDA receptors was important for triggering striatal LTP induced by Roscovitine. NMDA inhibition did not fully prevent LTP induction as previously reported (Calabresi et al., 1992b; Mahon et al., 2004; Lovinger, 2010). In those experiments where AP5 was present, the amplitude increase of the population spike persisted in a 26% compared to control. This result indicated that part of the increment in the synaptic amplitude was mediated by AMPA/KAR receptor modulation as reported elsewhere (Swenningsson et al., 2004). As for L channels, its inhibition totally abolished LTP induction by Roscovitine. It has been reported that L-type Ca channels were involved in striatal LTD induction



**Figure 10** Presynaptic and postsynaptic component of striatal synaptic plasticity induced by the Cdk5 inhibitor Roscovitine. (A) Temporal course of EPSC after HFS in the presence of Roscovitine in the recording pipette (20  $\mu$ M). HFS protocol induced LTD. (B) Representative traces of EPSC in the presence of Roscovitine in the recording pipette. (C) Temporal course of EPSC in the presence of Roscovitine (20  $\mu$ M) in the recording bath and H89 (5  $\mu$ M) in the recording pipette. Note that there were no changes in EPSC amplitude after HFS protocol. (D) Representative traces of EPSC in the presence of Roscovitine (20  $\mu$ M) in the recording bath and H89 (5  $\mu$ M) in the recording pipette.

(Wang et al., 2006); however, there were no studies relating L-type Ca channels with corticostriatal LTP. Cdk5 may modulate L-type Ca channels directly or indirectly through PKA activation; if the PKA pathway remains active due to the inhibition of Cdk5, PKA may modulate other cellular substrates than DARPP-32 that participate in corticostriatal plasticity too. PKA activity induced by D1 receptor stimulation phosphorylates L-type Ca channels (Hernández-López et al., 1997) and NMDA receptors (Flores-Hernández et al., 2002), both increases Ca influx. Then during Roscovitine LTP induction, an important  $Ca^{2+}$  influx is mediated through NMDA receptors and L-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels as reported previously (Kapur et al., 1998; Wankerl et al., 2010), favoring neuronal excitability (Mahon et al., 2004).

#### Both types of MSN exhibited LTP in the presence of Roscovitine

Some MSNs express D1/5P (substance P) (direct pathway) receptors and other D2/ENK (Enkephalins) (indirect path-

way) receptors, and it has been stated that MSNs from direct pathways express LTP through PKA signaling (Reynolds and Wickers, 2002), whereas the indirect pathway exhibits LTD through the stimulation of endocannabinoid receptors at the presynaptic cell (Loving, 2010). Nevertheless, cells from the indirect pathway can generate LTP through the stimulation of adenosine A2a receptors. A2a receptors are coupled to the cAMP/PKA pathway (Shen et al., 2008) and both neuronal types (direct and indirect pathways) are rich in DARPP-32 content (Bertran-Gonzalez et al., 2010). Our results in whole cell with D1 BAC mice showed that both types of neurons were able to express LTD in control and LTP in the presence of the Cdk5 inhibitor.

#### Conclusion

Striatal LTD is induced by postsynaptic mechanisms; nevertheless, its expression is maintained through presynaptic mechanisms which reduce neurotransmitter release (Wang

et al., 2006; Adermark et al., 2009; Lovinger, 2010). Cdk5 is widely expressed in pyramidal cells, which project into the striatum, from our results, we propose that Cdk5 inhibit neurotransmitter release in corticostriatal terminals and impede LTP expression. That is why inhibition of Cdk5 only at the postsynaptic cell did not affect LTD; it is the presynaptic Cdk5 activity, which favors LTD. For the modulation of LTP, Cdk5 inhibition has its effect at the postsynaptic level, modulating the cAMP/PKA/DARPP-32 pathway, which at the end may phosphorylate glutamate receptors (Roche et al., 1996) to increase the amplitude of the population spikes. These data together showed that Cdk5 inhibition induces LTP by decreasing LTD at the presynapse and favors LTP at the postsynapse.

#### AUTHOR CONTRIBUTION

Jorge Miranda-Barrientos and Elizabeth Nieto-Mendoza carried out the experiments, Jorge Miranda-Barrientos and Elizabeth Hernández-Echeagaray designed the experiments and analyzed data, Elizabeth Hernández-Echeagaray conceived and wrote the paper.

#### ACKNOWLEDGMENTS

J.M.B. and E.N.M. received Ph.D. fellowships from CONACYT. J.M.B. participated in this work as a partial fulfillment of the requirements of the Ph.D. degree in Biomedical Sciences at the Universidad Nacional Autónoma de México. We thank E. Mendoza for his technical help, The Mutant Mouse Regional Resource Center U4200010918, University of Missouri-MMRRC-RRRC, C. Rivera and X.G. Ayala for breeding BAC mice in the animal facility of the Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM. BAC mice were a donation of Dr Elvira Galarraja from IFC, UNAM.

#### FUNDING

This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT, UNAM) [grant number IN220811-3] and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [grant number 81062] (to E.H.E.).

#### REFERENCES

Adermark L, Tolani S, Lovinger DM (2009) Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity. *Eur J Neurosci* 23:32–41.

Bancay JW, Aisato M, Craig TJ, Morgan A, Burgoyne RD (2004) Regulation of the fusion pore conductance during exocytosis by cyclin-dependent kinase 5. *J Biol Chem* 279:41495–41502.

Bargas J, Ayala GX, Hernández E, Galarraja E (1998)  $Ca^{2+}$  channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res Bull* 48:521–524.

Bertran-Gonzalez J, Havel O, Cirrault J-A, Valjent F (2010) What is the degree of segregation between striatonigral and striatopallidal projections? *Front Neuroanat* 4:126.

Bibb JA, Snyder DL, Nishi A, Yan Z, Melzer L, Flinberg AA, Teal LH, Kwon YT, Cirrault JA, Corrick AJ, Huganir RL, Hemmings Jr HC, Nairn AC, Greengard P (1999) Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signaling in neurons. *Nature* 402:689–691.

Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1992a) Long-term potentiation in the striatum is unmasked by removing the voltage-dependent blockade of NMDA receptor channel. *Eur J Neurosci* 4:929–935.

Calabresi P, Maj R, Mercuri NB, Bernardi G (1992b) Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors is required for long-term synaptic depression in the striatum. *Neurosci Lett* 142:95–98.

Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Picconi B, Bernardi G, Chergui K, Svenningsson P, Flinberg AA, Greengard P (2000) Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. *J Neurosci* 20:8442–8451.

Centonze D, Picconi B, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P (2001) Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. *Eur J Neurosci* 13:1071–1077.

Chergui K, Svenningsson P, Greengard P (2004) Cyclin-dependent kinase 5 regulates dopaminergic and glutamatergic transmission in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2191–2196.

Flores-Hernández J, Cepeda C, Hernández-Echeagaray E, Calvert CR, Jolik ES, Flinberg AA, Greengard P, Levine MS (2002) Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol* 88:2010–2020.

Greengard P, Allen PB, Nairn AC (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23:435–447.

Gubellini P, Centonze D, Tropea D, Bernardi G, Calabresi P (2004) Induction of corticostriatal LTP by 3-nitropropionic acid requires the activation of mGluR1/PRC pathway. *Neuropharmacology* 46:761–769.

Hawcal AH, Benavides DR, Nguyen C, Kame JW, Hayashi K, Chabon P, Greengard P, Powell CM, Cooper JC, Bibb JA (2007) Cyclin-dependent kinase 5 governs learning and synaptic plasticity via control of NMDAR degradation. *Nat Neurosci* 10:880–886.

Hemmings HC Jr, Nairn AC, Greengard P (1994) DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. II. Comparison of the kinetics of phosphorylation of DARPP-32 and phosphatase inhibitor-1. *J Biol Chem* 269:14481–14487.

Hernández-López S, Bargas J, Samuels DJ, Reyes A, Galarraja E (1997) D1 Receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type  $Ca^{2+}$  conductance. *J Neurosci* 17:3204–3240.

Kapur A, Yeckel MF, Gray R, Johnston D (1998) L-Type calcium channels are required for one form of hippocampal mossy fiber LTP. *J Neurophysiol* 79:2181–2190.

Kim SH, Ryan TA (2010) Cdk5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron* 67:997–1009.

Li SS, Sun MK, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Vinade L, Kulkarni AB, Brady RO, Pant HC (2001) Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12742–12747.

Lovinger DM (2010) Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology* 58:951–961.

Mahon S, Deniau JM, Charpier S (2004) Corticostriatal plasticity: life after the depression. *Trends Neurosci* 27:462–467.

Meja GS, Coffey MC, Cambridge LM, Barnes PJ, Lum H, Newton R, Glemboyc MA (2004) Adenovirus-mediated delivery and expression of a cAMP-dependent protein kinase inhibitor gene to SCAS-20 epithelial cells abolishes the anti-inflammatory effects of roflumilast, salbutamol, and prostaglandin E2: a comparison with H-89. *Pharmacol Exp Ther* 308:833–844.

Nishi A, Snyder DL, Nairn AC, Greengard P (1995a) Role of calcineurin and protein phosphatase-1A in the regulation of DARPP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons. *J Neurochem* 72:2013–2021.

- Nishi A, Seyder GL, Flinberg AA, Thorne G, Aperto A, Naim AC, Greengard P (1999a) Requirement for DARPP-32 in mediating effect of dopamine D2 receptor activation. *Eur J Neurosci* 11:2589–2592.
- Ohashima T, Ogura H, Tomizawa K, Hayashi K, Suzuki H, Saito T, Kametani H, Nishi A, Bibb JA, Hironaga S, Matsui H, Mitsuhashi K (2005) Impairment of hippocampal long-term depression and defective spatial learning and memory in  $\beta$ 25 mice. *J Neurochem* 94:917–925.
- Pawlak V, Kerr JND (2008) Dopamine receptor activation is required for corticostriatal spike-timing-dependent plasticity. *J Neurosci* 28:2435–2446.
- Reynolds JN, Wickens JR (2002) Dopamine-dependent plasticity of corticostriatal synapses. *Neural Netw* 15:507–521.
- Roché WK, O'Shea RJ, Mammen AL, Bernhardt J, Hanganer RL (1996) Characterization of multiple phosphorylation sites on AMPA receptor subunit. *Neuron* 16:1179–1188.
- Svenningsson P, Nishi A, Thorne G, O'Connell JA, Naim AC, Greengard P (2004) DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:269–296.
- Shen W, Rajadurai M, Greengard P, Surmeier DJ (2008) Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* 321: 849–851.
- Su SC, Seo J, Pan JD, Samuels BA, Rudnik A, Ericson M, Nieve RL, Yee DT, Tsai LH (2012) Regulation of N-type voltage-gated calcium channels and presynaptic function by cyclin-dependent kinase 5. *Neuron* 75:673–687.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30:228–235.
- Surmeier DJ, Pettkin J, Shen W (2008) Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection. *Curr Opin Neurobiol* 18:621–628.
- Tomizawa K, Ohta J, Matsushita M, Moriwaki A, U ST, Takai K, Matsui H (2002) CaMK $\beta$ 25 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity. *J Neurosci* 22:2580–2597.
- Wang Z, Kal L, Day D, Bonnell J, Yin H, Ding J, Tatch T, Lovinger D, Surmeier J (2006) Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron* 50:443–452.
- Wanzenk K, Wehr D, Gerber R, Rumpf JJ, Clasen J (2010) L-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels: a single molecular switch for long-term potentiation/long-term depression-like plasticity and activity-dependent metaplasticity in humans. *J Neurosci* 30:6197–6204.

---

Received 23 January 2014; 14 February 2014; accepted 10 February 2014

Published as Immediate Publication 21 February 2014, doi:10.1042/AN20140006

---

## Referencias

- Adermark L., Talani G., Lovinger D.M. (2009) Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity. *Eur J Neurosci.*
- Aguilo A., Schwartz T.H., Kumar V.S., Peterlin Z.A., Tsiola A., Soriano E. et al. (1999) Involvement of Cajal-Retzius neurons in spontaneous correlated activity of embryonic and postnatal layer 1 from wild type and reeler mice. *Journal of Neuroscience* 19, 10856–10868.
- Akopian G., Crawford C., Beal M.F., Cappelletti M., Jakowec M.W., Petzinger G.M., Zheng L., Gheorghe S.L. (2008) Decreased striatal dopamine release underlies increased expression of long-term synaptic potentiation at corticostriatal synapses 24 h after 3-nitropropionic-acid-induced chemical hypoxia. *J Neurosci.* 28(38):9585-97.
- Albin R.L., A.B. Young, J.B. Penner (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders *Trends in Neurosciences*, 12, pp. 366–375
- Albin, R.L., Young, A.B. and Penney, J.B., (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders, *Trends Neurosci.*, 12 366-375.
- Alexander G.E. y Crutcher M.D. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel process- ing, *Trends Neurosci.*, 13 266-271.
- Alexander G.E., Crutcher M.D., DeLong M.R., (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, 'prefrontal' and 'limbic' functions, *Prog. Brain Res.*, 85 119-146.
- Alheid G.F., y Heimer L., (1988) New perspectives in basal fore- brain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid and corticopetal components of substantia innominata, *Neuroscience*, 27 1-39.
- Alvira D., Ferrer I., Gutierrez-Cuesta J., Garcia-Castro B., Pallàs M., Camins A. Activation of the calpain/cdk5/p25 pathway in the girus cinguli in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 14(4):309-13
- Angelo M., Plattner F., Giese K.P. (2006) Cyclin-dependent kinase 5 in synaptic plasticity, learning and memory. *J Neurochem.* 99(2):353-70.
- Anne S.L., Saudou F., Humbert S. (2007) Phosphorylation of huntingtin by cyclin-dependent kinase 5 is induced by DNA damage and regulates wild-type and mutant huntingtin toxicity in neurons. *J Neurosci.* 27(27):7318-28.
- Araujo D.M., Cherry S.R., Tatsukawa K.J., Toyokuni T., Kornblum H.I. (2000) Deficits in striatal dopamine D(2) receptors and energy metabolism detected by in vivo microPET imaging in a rat model of Huntington's disease. *Exp Neurol.* 2000 Dec;166(2):287-97.
- Arlotta P, Molyneaux BJ, Jabaudon D, Yoshida Y, Macklis JD. (2008) Ctip2 controls the differentiation of medium spiny neurons and the establishment of the cellular architecture of the striatum. *J Neurosci.* 28(3):622-32.

- Augood S.J., Faull R.L., Emson P.C. (1997) Dopamine D1 and D2 receptor gene expression in the striatum in Huntington's disease. *Ann Neurol.* 42(2):215-21.
- Augustin S.M., Beeler J.A., McGehee D.S., Zhuang X. (2014) Cyclic AMP and afferent activity govern bidirectional synaptic plasticity in striatopallidal neurons. *J Neurosci.* 34(19):6692-9.
- Bamford N.S., Robinson S., Palmiter R.D., Joyce J.A., Moore C., Meshul C.K. (2004) Dopamine modulates release from corticostriatal terminals. *J Neurosci.* 24(43):9541-52.
- Banke T.G., Bowie D., Lee H., Huganir R.L., Schousboe A., Traynelis S.F. (2000) Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* 20:89–102.
- Barclay J.W., Aldea M., Craig T.J., Morgan A., Burgoyne R.D. (2004) Regulation of the fusion pore conductance during exocytosis by cyclin-dependent kinase 5. *J Biol Chem.* 1;279(40)
- Bargas J., Ayala G.X., Hernández E., Galarraga E. (1998) Ca<sup>2+</sup>-channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res Bull.* 45(5):521-4.
- Barria A., Muller D., Derkach V., Griffith L.C., Soderling T.R. (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaMKII during long-term potentiation. *Science* 276:2042–2045.
- Beal. M.F., Brouillet. E., Jenkins. B.J., Ferrante. R.J., Kowall. N.W., Miller. J.M., Storey. E., Srivastava. R., Rosen. B.F., Hyman. B.T. (1993) Neurochemical and Histologic Characterization of Striatal Excitotoxic Lesions Produced by the Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionic Acid. *The Journal of Neuroscience*, 13(10): 4181-4192.
- Beaudette K.N., Lew J., Wang J.H. (1993) Substrate specificity characterization of a cdc2-like protein kinase purified from bovine brain. *J.Biol. Chem.* 268:20825–30
- Beckstead R.M. (1984) A projection to the striatum from the medial subdivision of the posterior group of the thalamus in the cat, *Brain Res.*, 300 351-356.
- Beffert U, Weeber E. J., Morfini G, Ko J, Brady S. T., Tsai L.H. , Sweatt J. D., Herz J. (2004) Reelin and Cyclin-Dependent Kinase 5-Dependent Signals Cooperate in Regulating Neuronal Migration and Synaptic Transmisión *The Journal of Neuroscience* 24(8):1897–1906 • 1897
- Benavides D.R., Bibb J.A. (2004) Role of Cdk5 in drug abuse and plasticity. *Ann N Y Acad Sci.* 1025:335-44.
- Benavides DR, Quinn JJ, Zhong P, Hawasli AH, DiLeone RJ, Kansy JW, Olausson P, Yan Z, Taylor JR, Bibb JA. (2007) Cdk5 modulates cocaine reward, motivation, and striatal neuron excitability. *J Neurosci.* Nov 21;27(47):12967-76.
- Berendse H.W., Galis-de Graaf., Y. y Groenewegen., H.J. (1992) Topographical organization and relationship with ventral stri-atal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat, *J. Comp. Neurol.*, 316 314-347.
- Bianchetta M.J., Lam T.T., Jones S.N., Morabito M.A. (2011) Cyclin-dependent kinase 5 regulates PSD-95 ubiquitination in neurons. *J Neurosci.* 31(33):12029-35.

Bibb J.A., Snyder G.L., Nishi A., Yan Z., Meijer L., Fienberg A.A., Tsai L.H., Kwon Y.T., Girault J.A., Czernik A.J., Haganir R.L., Hemmings H.C. Jr, Nairn A.C., Greengard P. (1999) Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature*. 402(6762):669-71

Bliss TV, Lomo T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973 Jul;232(2):331-56.

Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Haganir RL, Malinow R. (2006) Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron*. Jul 20;51(2):213-25.

Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD. (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat*. 196 ( Pt 4):527-42

Bolshakov V.Y., Siegelbaum S.A. (1994) Postsynaptic induction and presynaptic expression of hippocampal long-term depression. *Science*. 264(5162):1148-52.

Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R.J., Dolan, R., Leroy-Willing, A., Kowall, N.W., Beal, M.F. (1995) Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:7105–7109

Calabresi P., Gubellini P., Picconi B., Centonze D., Pisani A., Bonsi P., Greengard P., Hipskind R.A., Borrelli E., Bernardi G. (2001) Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J Neurosci*. 21(14)

Calabresi P., Maj R., Pisani A., Mercuri N.B., Bernardi G. (1992) Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J Neurosci*. 12(11):4224-33.

Calabresi P., Picconi B., Tozzi A., Di Filippo M. (2007) Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 30(5):211-9.

Calabresi P., Pisani A., Mercuri N.B., Bernardi G. (1992b) Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels. *Eur J Neurosci*. 4(10):929-935.

Carlsson M. y Carlsson A. (1990) Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia implication for schizophrenia and Parkinson's disease, *Trends Neurosci.*, 13 272-276.

Carpenter M.B. (1981) Anatomy of the corpus striatum and brain stem integrating systems. In V.B. Brooks (Ed.), *Handbook of Physiology*, Vol. 2, The Nervous System, American Physiological Society, Bethesda, MA, pp. 947-995.

Centonze D., Picconi B., Gubellini P., Bernardi G., Calabresi P. (2001) Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. *Eur J Neurosci*. 13(6):1071-7

Cepeda C., Hurst R.S., Calvert C.R, Hernández Echeagaray E., Nguyen OK., Jocoy E., Christian L.J., Ariano M.A., Levine M.S. (2003) Transient and Progressive Electrophysiological Alterations

in the Corticostriatal Pathway in a Mouse Model of Huntington's Disease *The Journal of Neuroscience*, 23(3):961–969-961

Cepeda C., Hurst R.S., Calvert C.R., Hernández-Echeagaray E., Nguyen O.K., Jocoy E., Christian L.J., Ariano M.A., Levine M.S. (2003) Transient and progressive electrophysiological alterations in the corticostriatal pathway in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*. 23(3):961-9.

Cepeda C., Murphy K.P., Parent M., Levine M.S. (2014) The role of dopamine in Huntington's disease. *Prog Brain Res*. 211:235-54.

Cepeda C., Wu N., André V.M., Cummings D.M., Levine M.S. (2007) The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Prog Neurobiol*. 81(5-6):253-71. Epub 2006 Dec 13

Chae T, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH. (1997) Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron*.;18(1):29-42

Chae T., Kwon Y.T., Bronson R., Dikkes P., Li E., Tsai L.H. (1997) Mice lacking P35, a neuronal-specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18 29–42.

Chen J.Y., Wang E.A., Cepeda C., (2013) Levine MS. Dopamine imbalance in Huntington's disease: a mechanism for the lack of behavioral flexibility. *Front Neurosci*. 7:114.

Chergui K., Svenningsson P., Greengard P. (2004) Cyclin-dependent kinase 5 regulates dopaminergic and glutamatergic transmission in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(7):2191-6.

Chergui K., Svenningsson P., Greengard P. (2004). Cyclin-dependent kinase 5 regulates dopaminergic and glutamatergic transmission in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(7):2191-6

Chern Y., Chiou J. Y., Lai H. L., Tsai M. H. (1995). Regulation of adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a adenosine receptor-mediated cyclic AMP response: Role for protein phosphatase 2A. *Molecular Pharmacology*, 48, 1–8.

Cheung Z.H., Ip N.Y. (2007) The roles of cyclin-dependent kinase 5 in dendrite and synapse development. *Biotechnol J*. 2(8):949-57

Choo Y.S., Johnson G.V., MacDonald M., Detloff P.J., Lesort M. (2004) Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum Mol Genet*. 13(14):1407-20. Epub 2004 May 26.

Collingridge G.L., Kehl S.J., McLennan H. (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol*. 334, 33–46.

Connor J.A., Petrozzino J., Pozzo-Miller L.D., Otani S. (1999) Calcium signals in long-term potentiation and long-term depression. *Can J Physiol Pharmacol*. 77(9):722-34.

Cools A., Van den Bercken J., Horstink M., Van Spaendonck K. and Berger H., (1981) The basal ganglia and the control of movement: the basal ganglia and the programming of behaviour, *Trends Neurosci.*, 4 124.

Crespo-Biel N, Camins A, Pallàs M, Canudas AM. (2009) Evidence of calpain/cdk5 pathway inhibition by lithium in 3-nitropropionic acid toxicity in vivo and in vitro. *Neuropharmacology*. 56(2):422-8.

Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D. (2006) Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*. 127(1):59-69.

D'Arcangelo G., Miao G.G., Chen S.C., Soares H.D., Morgan J.I. and Curran T. (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, 719–723

Dalbem A., Silveira C.V., Pedroso M.F., Breda R.V., Werne Baes C.V., Bartmann A.P., da Costa J.C. (2005) Altered distribution of striatal activity-dependent synaptic plasticity in the 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Brain Res*. 1047(2):148-58.

Dalbem A., Silveira C.V., Pedroso M.F., Breda R.V., Werne Baes C.V., Bartmann A.P., da Costa J.C. (2005) Altered distribution of striatal activity-dependent synaptic plasticity in the 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Brain Res*. 1047(2):148-58.

Davies J., Francis A.A., Jones A.W., Watkins J.C. (1981) 2-Amino-5-phosphonovalerate (2APV), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation. *Neurosci. Lett*. 21, 77–81

DeLong M.R. y Georgopoulos A.P. (1981) Motor functions of the basal ganglia. In J.M. Brookhart, V.B. Mountcastle, V.B. Brooks and S.R. Geiger (Eds.), *Handbook of Physiology, Sect. 1. The Nervous System, Vol. 2, Motor Control, Part 2*, American Physiological Society, Bethesda, MA, pp. 1017-1061.

DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*. 13(7):281-5

Derkach V., Barria A., Soderling T.R. (1999) Ca<sup>2+</sup> calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy 5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3269–3274.

Dhavan R, Tsai LH. (2001) A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Oct;2(10):749-59. Review.

Di Filippo M, Tozzi A, Picconi B, Ghiglieri V, Calabresi P. (2007) Plastic abnormalities in experimental Huntington's disease. *Curr Opin Pharmacol*. 7(1):106-11

DiFiglia M., Pasik P. y Pasik T. (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys, *Brain Res.*, 114 245 -256.

DiFiglia M., Sapp E., Chase K.O., Davies S.W., Bates G.P., Vonsattel J.P., Aronin N. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*. 277(5334)

- Dionisio L., Arias V., Bouzat C., Esandi Mdel C. (2013) GABAA receptor plasticity in Jurkat T cells. *Biochimie*. 95(12):2376-84.
- Dubé L, Smith AD, Bolam JP. (1988) Identification of synaptic terminals of thalamic or cortical origin in contact with distinct medium-size spiny neurons in the rat neostriatum. *J Comp Neurol*. 267(4):455-71.
- Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, Folstein S, Ross C, Franz M, Abbott M, et al. (1993) Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet*. 4(4):387-92.
- Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Huganir RL, Malinow R. (2003) PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci*. Feb;6(2):136-43.
- Fernández de Sevilla D., Núñez A., Borde M., Malinow R., Buño W. (2008) Cholinergic-mediated IP3-receptor activation induces long-lasting synaptic enhancement in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*. 28(6):1469-78.
- Fino E., Venance L. (2010) Spike-timing dependent plasticity in the striatum. *Front Synaptic Neurosci* 2:6.
- Fletcher AI1, Shuang R, Giovannucci DR, Zhang L, Bittner MA, Stuenkel EL. (1999) Regulation of exocytosis by cyclin-dependent kinase 5 via phosphorylation of Munc18. *J Biol Chem*. 274(7):4027-35.
- Flores-Hernández J., Cepeda C., Hernández-Echeagaray E., Calvert C.R., Jokel E.S., Fienberg A.A., Greengard P., Levine M.S. (2002) Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol*. 88(6):3010-20.
- Floyd SR1, Porro EB, Slepnev VI, Ochoa GC, Tsai LH, De Camilli P. (2001) Amphiphysin 1 binds the cyclin-dependent kinase (cdk) 5 regulatory subunit p35 and is phosphorylated by cdk5 and cdc2. *J Biol Chem*. 276(11):8104-10.
- Gage A.T., Reyes M., Stanton P.K. (1997) Nitric-oxide-guanylyl-cyclase-dependent and -independent components of multiple forms of long-term synaptic depression. *Hippocampus*. 7
- Gerfen C.R. (1984) The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems, *Nature*, 311 461-464.
- Gerfen C.R. (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization *Trends in Neurosciences*, 15, pp. 133–139
- Gerfen C.R., (1990) The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination, *Science*, 246 385-388
- Gil JM, Rego AC. (2009) The R6 lines of transgenic mice: a model for screening new therapies for Huntington's disease. *Brain Res Rev*. 59(2):410-31.

- Gilmore E.C., Ohshima T., Goffinet A.M., Kulkarni A.B., Herrup K. (1998) Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J Neurosci.* 18(16):6370-7.
- Graveland G.A. y DiFiglia M. (1985) The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum, *Brain Res.*, 327 307- 311.
- Graveland G.A. y DiFiglia M., (1985) The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum, *Brain Res.*, 327 307- 311.
- Graybiel A. M. (1986) in *Neuropeptides in Neurologic and Psychiatric Disease*, eds. Martin, J. P. & Barchas, J. D. (Raven, New York), pp. 443-457.
- Graybiel A.M., (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia, *Trends Neurosci.*, 13 244-254.
- Graybiel AM. (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol.* 1995 Dec;5(6):733-41
- Greengard P., Allen P.B., Nairn A.C. (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron.* 23(3):435-47
- Grey KB, Burrell BD. (2010) Co-induction of LTP and LTD and its regulation by protein kinases and phosphatases. *J Neurophysiol.* May;103(5):2737-46.
- Groenewegen HJ. (2003) The basal ganglia and motor control. *Neural Plast.* 2003;10(1-2):107-20.
- Gubellini P., Centonze D., Tropepi D., Bernardi G., Calabresi P. (2004) Induction of corticostriatal LTP by 3-nitropropionic acid requires the activation of mGluR1/PKC pathway. *Neuropharmacology.* 46(6):761-9.
- Gubellini P., Centonze D., Tropepi D., Bernardi G., Calabresi P. (2004) Induction of corticostriatal LTP by 3-nitropropionic acid requires the activation of mGluR1/PKC pathway. *Neuropharmacology.* 46(6):761-9.
- Haber S.N., Lynd E., Klein C. y Groenewegen H.J. (1990) Topographic organization of the ventral striatal efferent projections in the rhesus monkey: an anterograde tracing study, *J. Comp. Neurol.*, 293 282-288.
- Hallows J.L., Iosif R.E., Biasell R.D., Vincent I. (2006) p35/p25 is not essential for tau and cytoskeletal pathology or neuronal loss in Niemann-Pick type C disease. *J Neurosci.* 26(10):2738-44.
- Harada T., Morooka T., Ogawa S., Nishida E. (2001) ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nature Cell Biol.* 3, 453–459.
- Hata Y, Südhof TC. (1995) A novel ubiquitous form of Munc-18 interacts with multiple syntaxins. Use of the yeast two-hybrid system to study interactions between proteins involved in membrane traffic. *J Biol Chem.* 270(22):13022-8.

Hawasli A.H., Benavides D.R., Nguyen C., Kansy J.W., Hayashi K., Chambon P., Greengard P., Powell C.M., Cooper D.C., Bibb J.A. (2007) Cyclin-dependent kinase 5 governs learning and synaptic plasticity via control of NMDAR degradation. *Nat Neurosci.* 10(7):880-6

Hawes S.L., Gillani F., Evans R.C., Benkert E.A., Blackwell K.T. (2013) Sensitivity to theta-burst timing permits LTP in dorsal striatal adult brain slice. *J Neurophysiol.* 110(9):2027-36.

Heinsen H, Rub U, Bauer M. (1999) Nerve cell loss in the thalamic mediodorsal nucleus in Huntington's disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 97: 613–22.

Hernández-López S., Bargas J., Surmeier D.J., Reyes A., Galarraga E. (1997) D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *J Neurosci.* 17(9):3334-42.

Hikosaka O, Takikawa Y, Kawagoe R. (2000) Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol Rev.* 80(3):953-78

Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, McCutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li XJ, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, (1999) A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron.* 23(1):181-92.

Huang Y.Y., Colley P.A., Routtenberg A. (1992) Postsynaptic then presynaptic protein kinase C activity may be necessary for long-term potentiation. *Neuroscience* 49:819–827.

Humbert S., Dhavan R. & Tsai L. (2000) p39 activates CDK5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 113, 975–983.

Humbert S., Dhavan R., Tsai L. (2000) p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton, *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 6) 975– 983.

Humbert S., Lanier L.M., Tsai L.H. (2000) Synaptic localization of p39, a neuronal activator of cdk5, *NeuroReport* 11 2213–2216.

Ishiguro K., Kobayashi S., Omori A., Takamatsu M., Yonekura S., Anzai K., Imahori K., Uchida T. (1994) Identification of the 23 kDa subunit of tau protein kinase II as a putative activator of cdk5 in bovine brain, *FEBS Lett.* 342 203– 208.

Ismailov I., Kalikulov D., Inoue T., Friedlander M.J. (2004) The kinetic profile of intracellular calcium predicts long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci.* 24(44):9847-61

Jeste DV, Barban L, Parisi J. (1984) Reduced Purkinje cell density in Huntington's disease. *Exp Neurol.* 85:78–86.

Kameyama K., Lee H.K., Bear M.F., Huganir R.L. (1998) Involvement of a postsynaptic protein kinase A substrate in the expression of homosynaptic long-term depression. *Neuron* 21:1163–1175.

KAPUR A., YECKEL M.F, GRAY R., y JOHNSTON D. (1998) L-Type Calcium channels are required for one form of Hippocampal Mossy fiber LTP 79:2181-2190,. *J Neurophysiol*

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 1995 Dec;18(12):527-35

Kawaguchi Y. (1997) Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci Res.* 27(1):1-8.

Kim DS, Froelick GJ, Palmiter RD.(2002) Dopamine-dependent desensitization of dopaminergic signaling in the developing mouse striatum. *J Neurosci.* 22(22):9841-9.

Kim S.H., Ryan T.A. (2010) CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron.* 67(5):797-809.

Kim S.H., Ryan T.A. (2010) CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron.* 67(5):797-809

Kim Y.J., Yi Y., Sapp E., Wang Y., Cuiffo B., Kegel K.B., Qin Z.H., Aronin N., y DiFiglia M.. (2001) Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo Calpain dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:12784–12789.

Ko J., Humbert S., Bronson R.T., Takahashi S., Kulkarni A.B., Li E., Tsai L.H. (2001) p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J. Neurosci.* 21 6758– 6771.

Kobayashi S. et al., (1993) A Cdc2-related kinase PSSALRE/Cdk5 is homologous with the 30 kDa subunit of Tau protein kinase II, a proline-directed protein kinase associated with microtubule. *FEBS Lett.* 335, 171–175.

Konnerth A., Dreessen J., Augustine G.J. (1992) Brief dendritic calcium signals initiate long-lasting synaptic depression in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:7051–5.

Kourrich S., Glasgow S.D., Caruana D.A., Chapman C.A. (2008) Postsynaptic signals mediating induction of long-term synaptic depression in the entorhinal cortex. *Neural Plast.* 2008:840374.

Krieger C. y Duchon M.R. (2002) Mitochondria, Ca<sup>2+</sup> and neurodegenerative disease. *Eur. J. Pharmacol.* 447, 177–188.

Kull B., Svenningsson P., Fredholm B. B. (2000). Adenosine A<sub>2A</sub> receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Molecular Pharmacology*, 58, 771–777.

Lai K.O., Ip N.Y. (2009) Recent advances in understanding the roles of Cdk5 in synaptic plasticity. *Biochim Biophys Acta.* 1792(8):741-5.

Lai K.O., Wong A.S., Cheung M.C., Xu P., Liang Z., Lok K.C., Xie H., Palko M.E., Yung W.H., Tessarollo L., Cheung Z.H., Ip N.Y. (2012) TrkB phosphorylation by Cdk5 is required for activity-dependent structural plasticity and spatial memory. *Nat Neurosci.* 15(11):1506-15.

Landwehrmeyer G. B., Standaert D. G., Testa C. M., Penney J. B., Jr., Young, A. B. (1995) *J. Neurosci.* 15, 5297–5307.

- Lee JH, Kim KT. (2004) Induction of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 through the extracellular-signal-regulated kinase and protein kinase A pathways during retinoic-acid mediated neuronal differentiation in human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. *J Neurochem* (3):634-47.
- Lee M.S., Kwon Y.T., Li M., Peng J., Friedlander R.M, Tsai L.H. (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain, *Nature* 405 360–364.
- Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*. May 18;405(6784):360-4.
- Lee, H.K. (2006) AMPA receptor phosphorylation in synaptic plasticity: insights from knockin mice. In: Kittler, J.; Moss, S.J., editors. *The Dynamic Synapse: Molecular Methods in Ionotropic Receptor Biology*. Boca Raton, FL: CRC Press;
- Lew J., Beaudette K., Litwin C. M. E. y Wang J. H. (1992) Purification and characterization of a novel proline-directed protein kinase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 267, 13383–13390.
- Lew J., Huang Q.Q., Qi Z., Winkfein R.J., Aebersold R., Hunt T., Wang J.H. (1994) A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5, *Nature* 371 423– 426.
- Li B. S., Zhang L., Gu J., Amin N. D., Pant H. C. (2000) Integrin alpha(1) beta(1)-mediated activation of cyclin-dependent kinase 5 activity is involved in neurite outgrowth and human neurofilament protein H Lys–Ser–Pro tail domain phosphorylation. *J. Neurosci.* 20, 6055–6062.
- Li B.S., Sun M.K., Zhang L., Takahashi S., Ma W., Vinade L., Kulkarni A.B., Brady R.O., Pant H.C. (2001) Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(22):12742-7.
- Liles S.L. y Updyke B.V. (1985) Projection of the digit and wrist area of precentral gyrus to the putamen: relation between topography and physiological properties of neurons in the putamen, *Brain Res.*, 339 245-255.
- Lisman J., Yasuda R., Raghavachari S. (2012) Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci.* 13(3):169-82
- Lovinger D.M. (2008) Presynaptic modulation by endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol.*
- Lovinger D.M. (2010) Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology.* 58(7):951-61
- Lovinger D.M., Partridge J.G., Tang K.C. (2003) Plastic control of striatal glutamatergic transmission by ensemble actions of several neurotransmitters and targets for drugs of abuse.
- Lovinger D.M., Tyler E.C., Merritt A. (1993) Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum. *J Neurophysiol.* 70(5):1937-49.
- Lovinger D.M., Wong K.L., Murakami K., Routtenberg A. (1987) Protein kinase C inhibitors eliminate hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* 436:177–183.

- Lunkes A., Lindenberg K.S., Ben-Haiem L., Weber C., Devys D., Landwehrmeyer G.B., Mandel J.L., Trottier Y. (2002). Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol. Cell.* 10:259–269.
- Luo S, Vacher C, Davies JE, Rubinsztein DC. (2005) Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity. *J Cell Biol.* 169(4):647-56.
- Macdonald V, Halliday G. (2002) Pyramidal cell loss in motor cortices in Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 10: 378–86.
- Mahon S., Deniau J.M., Charpier S. (2004) Corticostriatal plasticity: life after the depression. *Trends Neurosci.* 27(8):460-7.
- Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN. (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature.* 1989 Aug 17;340(6234):554-7.
- Marsden C.D. (1980) The enigma of the basal ganglia and movement, *Trends Neurosci.*, 3 284-287.
- Marsden C.D. (1981) The basal ganglia and the control of movement: motor activity and the outputs of the basal ganglia, *Trends Neurosci.*, 4 124-125.
- Matsuura I. y Wang J. H. (1996) Demonstration of cyclindependent kinase inhibitory serine/threonine kinase in bovine thymus. *J. Biol. Chem.* 271, 5443–5450.
- Mayer M.L., Westbrook G.L., Guthrie P.B. (1984) Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261–263.
- Mendoza E, Miranda-Barrientos JA, Vázquez-Roque RA, Morales-Herrera E, Ruelas A, De la Rosa G, Flores G, Hernández-Echeagaray E. (2014) In vivo mitochondrial inhibition alters corticostriatal synaptic function and the modulatory effects of neurotrophins. *Neuroscience.*
- Meyerson M. et al. (1992) A family of human CDC2-related protein kinases. *EMBO J.* 11, 2909–2917
- Milakovic T., Johnson G.V. (2005) Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem.* 280(35):30773-82. Epub 2005 Jun 27.
- Miranda-Barrientos J, Nieto-Mendoza E and Hernández-Echeagaray E (2014) The Cdk5 inhibitor Roscovitine increases LTP induction in corticostriatal synapses. *ASN NEURO* 6(2)
- Morabito M.A., Sheng M., Tsai L.H. (2004) Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates the N-terminal domain of the postsynaptic density protein PSD-95 in neurons. *J Neurosci.* 24(4):865-76.
- Morimoto K., Sato K., Sato S., Yamada N., Hayabara T. (1998) Time-dependent changes in rat hippocampal synapsin I mRNA expression during long-term potentiation. *Brain Res.* 783(1):57-62.

- Morris R.G. (2013) NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology*. 2013 Nov;74:32-40.
- Mulkey R.M., Endo S., Shenolikar S., Malenka R.C. (1994) Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression *Nature*. 369(6480):486-8.
- Nakazawa T, Komai S, Tezuka T, Hisatsune C, Umemori H, Semba K, Mishina M, Manabe T, (2001) Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Biol Chem*. Jan 5;276(1):693-9.
- Noble W., Olm V., Takata K., Casey E, Mary O., Meyerson J., Gaynor K., LaFrancois J, Wang L., Kondo T. Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo, *Neuron* 38 (2003) 555–565.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984;307:462–465.
- Ogawa M., Miyata T., Nakajima K., Yagyu K., Seike M., Ikenaka K. et al. (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14, 899–912.
- Ohshima T., Ogura H., Tomizawa K., Hayashi K., Suzuki H., Saito T., Kamei H., Nishi A., Bibb J.A., Hisanaga S., Matsui H., Mikoshiba K. (2005) Impairment of hippocampal long-term depression and defective spatial learning and memory in p35 mice. *Journal of Neurochemistry* ;94(4):917-25
- Ohshima T., Ward J.M., Huh C.G., Longenecker G., Veeranna G., Pant H.C., Brady R.O., Martin L.J, Kulkarni AB. (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 11173–11178.
- Oka H. (1980) Organization of the cortico-caudate projections. A horseradish peroxidase study in the cat, *Exp. Brain Res.*, 40 203-208.
- Pang Z, Geddes JW. (1997) Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J Neurosci.* 17(9):3064-73.
- Panov AV1, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci.* 5(8):731-6
- Paoletti P., Vila I., Rifé M., Lizcano J.M., Alberch J., Ginés S. (2008) Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5. *J Neurosci.* 28(40):10090-101.
- Parent A Hazrati LN. (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev.* 1995 Jan;20(1):91-127

- Parent A. (1986) *Comparative Neurobiology of the Basal Ganglia* (Wiley, New York), pp. 151-157.
- Parent A. y Hazrati L.-N., (1994) Multiple striatal representation in primate substantia nigra, *J. Comp. Neurol.*, 344 305- 320.
- Parent A., (1990) Extrinsic connections of the basal ganglia, *Trends Neurosci.*, 13 254-258.
- Park K.H., Lu G., Fan J., Raymond L.A., Leavitt B.R. (2012) Decreasing Levels of the cdk5 Activators, p25 and p35, Reduces Excitotoxicity in Striatal Neurons. *J Huntingtons Dis.* 1
- Partridge JG1, Tang KC, Lovinger DM. Regional and postnatal heterogeneity of activity-dependent long-term changes in synaptic efficacy in the dorsal striatum. *J Neurophysiol.* 2000 Sep; 84(3):1422-9.
- Patrick G. N., Zhou P., Kwon Y. T., Howley P. M., Tsai. L. H. (1998) p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin–proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 24057–24064
- Patrick G.N., Zukerberg L., Nikolic M., de la Monte S., Dikkes P., Tsai LH. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration, *Nature* 402 615–622.
- Pei J. J. et al., (1998) Accumulation of cyclin–dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer’s disease neurofibrillary degeneration. *Brain Res.* 797, 267–277.
- Penney Jr., J.B. and Young, A.B., (1983) Speculation on the functional anatomy of basal ganglia disorders, *Annu. Rev., Neurosci.*, 6 73-94.
- Percheron G. y Filion M. (1991) Parallel processing in the basal ganglia: up to a point [Letter], *Trends Neurosci.*, 14 55-56.
- Pevsner J, Volkandt W, Wong BR, Scheller RH. (1994) Two rat homologs of clathrin-associated adaptor proteins. *Gene.*;146(2):279-83.
- Pickrell A.M., Fukui H., Wang X., Pinto M., Moraes C.T. (2011) The striatum is highly susceptible to mitochondrial oxidative phosphorylation dysfunctions. *J Neurosci.* 31(27):9895-904
- Plattner F., Hernández A., Kistler T.M., Pozo K., Zhong P., Yuen E.Y., Tan C., Hawasli A.H., Cooke S.F., Nishi A., Guo A., Wiederhold T., Yan Z., Bibb J.A. (2014) Memory enhancement by targeting Cdk5 regulation of NR2B. *Neuron.* 81(5):1070-83.
- Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE. (1995) Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci.* 15(5 Pt 2):3775-87.
- Purves. D., Fitzpatrick. D., Augustine. J., Katz. L. (2001) *Neuroscience*
- Ragsdale Jr., C.W. y Graybiel A.M. (1981) The fronto-striatal projection in the cat and monkey and its relationship to inhomogeneities established by acetylcholinesterase histochemistry, *Brain Res.*, 208 259-266.

Ramakers G.M., Pasinelli P., van Beest M., van der Slot A., Gispen W.H., De Graan P.N. (2000) Activation of pre- and postsynaptic protein kinase C during tetraethylammonium-induced long-term potentiation in the CA1 field of the hippocampus. *Neurosci Lett.* 286(1):53-6.

Reyes M., Stanton P.K. (1996) Induction of hippocampal long-term depression requires release of Ca<sup>2+</sup> from separate presynaptic and postsynaptic intracellular stores. *J Neurosci.* 16(19):5951-60.

Reynolds J.N., Wickens J.R. (2002) Dopamine-dependent plasticity of corticostriatal synapses. *Neural Netw.* 15(4-6):507-21

Rivera A, Cuéllar B, Girón FJ, Grandy DK, de la Calle A, Moratalla R. (2002) Dopamine D4 receptors are heterogeneously distributed in the striosomes/matrix compartments of the striatum. *J Neurochem.* 80(2):219-29.

Roche K.W., O'Brien R.J., Mammen A.L., Bernhardt J., Huganir R.L. (1996) Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 16:1179–1188.

Rogers Justin T., Rusiana Ian, Trotter Justin, Lisa Zhao,<sup>3</sup> Erika Donaldson,<sup>1,2</sup> Daniel T.S. Pak,<sup>4</sup> Lenard W. Babus,<sup>5</sup> Melinda Peters,<sup>1,2</sup> Jessica L. Banko,<sup>2,6</sup> Pascale Chavis,<sup>7,8,9</sup> G. William Rebeck,<sup>10</sup> Hyang-Sook Hoe,<sup>5,11</sup> and Edwin J. Weeber (2012) Reelin supplementation enhances cognitive ability, synaptic plasticity, and dendritic spine density. *Learning & Memory* 18: 558-564

Rosenstock TR, Carvalho AC, Jurkiewicz A, Frussa-Filho R, Smaili SS (2004) Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurochem.* 88(5):1220-8.

Royce G.J., (1987) Recent research on the centromedian and parafascicular nuclei. In M.B. Carpenter and A. Jayaraman (Eds.), *The Basal Ganglia I1: Structure and Function-Current Concepts*, Vol. 32: *Advances in Behav. Biol.*, Plenum Press, New York, pp. 293-319.

Russo P., Taly A. (2012)  $\alpha 7$ -Nicotinic acetylcholine receptors: an old actor for new different roles. *Curr Drug Targets.* 13(5):574-8.

Sadikot A.F., Parent A., Smith Y. y Bolam, J.P. (1992) Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey: a light and electron microscopic study of the thalamostriatal projection in relation to striatal heterogeneity, *J. Comp. Neurol.*, 320 228-242.

Saliba R.S., Kretschmannova K., Moss S.J. (2012) Activity-dependent phosphorylation of GABAA receptors regulates receptor insertion and tonic current. *EMBO J.*;31(13):2937-51.

Sato K., Morimoto K., Suemaru S., Sato T., Yamada N. (2000) Increased synapsin I immunoreactivity during long-term potentiation in rat hippocampus. *Brain Res.* 872(1-2):219-22.

Scannevin, R. H., Huganir R. L. (2000) *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 133–141.

- Schilling B., Gafni J., Torcassi C., Cong X., Row R.H., LaFevre-Bernt M.A., Cusack M.P., Ratovitski T., Hirschhorn R., Ross C.A., Gibson B.W., Ellerby L.M. (2006) Huntingtin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. Modulation of cleavage and toxicity. *J Biol Chem.* 281(33):23686-97. Epub 2006 Jun 16
- Seiwell A.P., Reverte M.E., Duvauchelle C.L. (2007) Increased accumbens Cdk5 expression in rats after short-access to self-administered cocaine, but not after long-access sessions. *Neurosci Lett.* 417(1):100-5
- Selemon L.D. y Goldman-Rakic P.S. (1991) Parallel processing in the basal ganglia: up to a point [Reply]. *Trends Neurosci.*, 14 1 58 59.
- Shen X1, Lin X, De Wilde P. (2008) Oscillations and spiking pairs: behavior of a neuronal model with STDP learning. *Neural Comput.* Aug;20(8):2037-69.
- Shibuki K., Okada D. (1992) Cerebellar long-term potentiation under suppressed postsynaptic Ca<sup>2+</sup> activity. *Neuroreport.* 3:231-4
- Singla S, Kreitzer AC, Malenka RC. (2007) Mechanisms for synapse specificity during striatal long-term depression. *J Neurosci.* May 9;27(19):5260-4.
- Soda T., Nakashima R., Watanabe D., Nakajima K., Pastan I. and Nakanishi S. (2003) Segregation and coactivation of developing neocortical layer 1 neurons. *Journal of Neuroscience* 23, 6272-6279.
- Son M.Y., Chung S.H. (2010) Expression of p25, an aberrant cyclin-dependent kinase 5 activator, stimulates basal secretion in PC12 cells. *Mol Cells.* 29(1):51-6.
- Spargo E, Everall IP, Lantos PL. (1993) Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 56:487-91.
- Stanton P.K., Winterer J., Bailey C.P., Kyrozis A., Raginov I., Laube G., Veh R.W., Nguyen C.Q., Müller W. (2003) Long-term depression of presynaptic release from the readily releasable vesicle pool induced by NMDA receptor-dependent retrograde nitric oxide. *J Neurosci.* 23(13):5936-44.
- Su S.C., Seo J., Pan J.Q., Samuels B.A., Rudenko A., Ericsson M., Neve R.L., Yue D.T., Tsai L.H. (2012) Regulation of N-type voltage-gated calcium channels and presynaptic function by cyclin-dependent kinase 5. *Neuron.* 75(4):675-87
- Su SC, Tsai LH. (2011) Cyclin-dependent kinases in brain development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:465-91.
- Sun KH, de Pablo Y, Vincent F, Shah K. (2008) Deregulated Cdk5 promotes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J Neurochem.* 2008 Oct;107(1):265-78.
- Surmeier D.J., Ding J., Day M., Wang Z., Shen W. (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci.* 30(5):228-35.

- Takahashi M., Iseki E., Kosaka K. (2000) Cdk5 and munc-18/p67 co-localization in early stage neurofibrillary tangles-bearing neurons in Alzheimer type dementia brains. *J Neurol Sci.*;172(1):63-9.
- Tan TC, Valova VA, Malladi CS, Graham ME, Berven LA, Jupp OJ, Hansra G, McClure SJ, Sarcevic B, Boadle RA, Larsen MR, Cousin MA, Robinson PJ. (2003) Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol.* 2003 Aug;5(8):701-10.
- Tang T.S., Chen X., Liu J., Bezprozvanny I. (2007) Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci.* 27(30):7899-910.
- Tepper JM, Tecuapetla F, Koós T, Ibáñez-Sandoval O. (2010) Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat.* 2010 Dec 29;4:150.
- Tepper JM, Bolam JP. (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol.* Dec;14(6):685-92
- Tokuoka H. et al. (2000). Brain-derived neurotrophic factor-induced phosphorylation of neurofilament-H subunit in primary cultures of embryo rat cortical neurons. *J. Cell Sci.* 113, 1059–1068
- Tomizawa K., Sunada S., Lu Y.F., Oda Y., Kinuta M., Ohshima T., Saito T., Wei F.Y., Matsushita M., Li S.T., Tsutsui K., Hisanaga S., Mikoshiba K., Takei K., Matsui H. (2003) Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Biol.*;163(4):813-24
- Town T., Zolton J., Shaffner R., Schnell B., Crescentini R., Wu Y., Zeng J., DelleDonne A., Obregon D., Tan J. (2002) p35/Cdk5 pathway mediates soluble amyloid-beta peptide-induced tau phosphorylation in vitro. *J. Neurosci. Res.* 69 362– 372.
- Tsai L.H., Delalle I., Caviness V.S.Jr., Chae T., Harlow E. (1994) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5, *Nature* 371 419– 423.
- Usdin MT1, Shelbourne PF, Myers RM, Madison DV. (1999) Impaired synaptic plasticity in mice carrying the Huntington's disease mutation. *Hum Mol Genet.* 8(5):839-46.
- Vallar L, Maldolesi J: Mechanism of signal transduction of the dopamine D2 receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 1989, 10, 74–77.
- Van Dellen A., Welch J., Dixon R.M., Cordery P., York D., Styles P., Blakemore C., Hannan A.J. (2000) N-Acetylaspartate and DARPP-32 levels decrease in the corpus striatum of Huntington's disease mice. *Neuroreport.* 11(17):3751-7.
- van den Heuvel S., Harlow E. (1993) *Science* 262, 2050–2054
- Vonsattel J.P. y DiFiglia M. (1998) Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 369–384
- Vonsattel J.P., Myers R.H., Stevens T.J., Ferrante R.J., Bird E.D., Richardson Jr E.P., (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44 559–577.

- Walker, F.O. (2007) Huntington's disease. *Seminars*. 369:218-228.
- Wang Z., Kai L., Day M., Ronesi J., Yin H.H., Ding J., Tkatch T., Lovinger D.M., Surmeier D.J. (2006) Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron*. 50(3):443-52.
- Wang Z., Kai L., Day M., Ronesi J., Yin H.H., Ding J., Tkatch T., Lovinger D.M., Surmeier D.J. (2006) Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron*. 50(3):443-52
- Wankerl K., Weise D., Gentner R., Rumpf J.J., Classen J. (2010) L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels: a single molecular switch for long-term potentiation/long-term depression-like plasticity and activity-dependent metaplasticity in humans. *J Neurosci*. 30(18):6197-204.
- Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian JM, Forster E, Sweatt JD, Herz J (2002) Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 277:39944-39952
- Wellington C.L., Ellerby L.M., Gutekunst C.A., Rogers D., Warby S., Graham R.K., Loubser O., van Raamsdonk J., Singaraja R., Yang Y.Z., et al. (2002). Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci*. 22:7862–7872.
- Wichmann T. y DeLong M.R. (1993) Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities, *AdJ. Neurol.*, 60 53-61.
- Wilson, C.J. and Groves, P.M., Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular injection of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, 194 (1980) 599-615.
- Winder D.G., Sweatt J.D. (2001) Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2:461–474.
- Wong A.S., Lee R.H., Cheung A.Y., Yeung P.K., Chung S.K., Cheung Z.H., Ip N.Y. (2011) Cdk5-mediated phosphorylation of endophilin B1 is required for induced autophagy in models of Parkinson's disease. *Nat Cell Biol*. 13(5):568-79.
- Yamazaki Y., Fujii S., Aihara T., Mikoshiba K. (2012) Activation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors during preconditioning low-frequency stimulation leads to reversal of long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Neuroscience*. 5;207:1-11.
- Yasuda H., Barth A.L., Stellwagen D., Malenka R.C. (2003) A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction. *Nat Neurosci* 6:15–16.
- Youn D.H., Gerber G., Sather W.A. (2013) Ionotropic glutamate receptors and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in long-term potentiation of spinal dorsal horn synapses and pain hypersensitivity. *Neural Plast.*
- Zeron MM1, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, Hayden MR, Raymond LA. (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron*.33(6):849-60

Zhang J., Cicero S. A., Wang L., Romito-Digiacoimo R. R., Yang Y., Herrup K. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 8772–8777

Zhuo M., Hu Y., Schultz C., Kandel E.R., Hawkins R.D. (1994) Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. Nature 368:635–639.

Zuccato C., Cattaneo E. (2007) Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. Prog Neurobiol. 81(5-6):294-330.

Zuccato C., Liber D., Ramos C., Tarditi A., Rigamonti D., Tartari M., Valenza M., Cattaneo E. (2005) Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery Pharmacol Res. 52(2):133-9.

Zukerberg L. R. et al., (2000) Cdk5 links c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. Neuron 26, 633–646.