

**LA PROTEÍNA PRION INHIBE EL TRANSPORTE AXONAL  
RÁPIDO A TRAVÉS DE UN MECANISMO QUE INVOLUCRA A  
LA CASEÍNA QUINASA 2 (CK2)**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Exactas Física y Naturales

Ciencias Biológicas



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**Tesinista:** Buratti Fiamma Ayelén

**Firma:**.....

**Director:** Pigino Gustavo

**Firma:**.....



**Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra**

INIMEC – CONICET – UNC

AÑO 2018

# PROTEÍNA PRION INHIBE EL TRANSPORTE AXONAL RÁPIDO A TRAVÉS DE UN MECANISMO QUE INVOLUCRA LA CASEÍNA QUINASA 2 (CK2)

## TRIBUNAL EXAMINADOR

Dra. Andrea Cragolini

Firma.....

Dr. Gustavo Baiardi

Firma.....

Dr. Benjamín Caruso

Firma.....

Calificación:.....

Fecha:.....

Un profundo agradecimiento a mi padre, que no está aquí conmigo, que lo dio todo para que pueda estudiar lejos de casa y me acompañó lo más que pudo en esta vida; a mi hermano que me subió a sus hombros cuando más lo necesité. A mi madre que siempre me contuvo en toda la carrera. Y a mi mentor, Gustavo, que confió en mí abriéndome las puertas de su laboratorio, y de su hogar. GRACIAS a ellos.

## INDICE

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
1. Enfermedades neurodegenerativas	
2. Enfermedades priónicas	
- Definición	
- Reseña histórica	
- Estructura y toxicidad	
- Distribución de la proteína prion en el humano	
- Función normal de la proteína prion en el sistema nervioso central	
Control de la mielinización axonal	
Formación y control de la función sináptica	
Regulación de la actividad de quinasas	
3. Transporte axonal	
- Importancia del transporte axonal	
- Tasas del transporte axonal	
- Motores moleculares encargados del transporte axonal rápido	
- Mecanismos regulatorios del transporte axonal rápido	
- Proteínas patológicas alteran el TA rápido mediante la activación de proteínas quinasas axonales	
HIPOTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
➤ Cultivo celular	
➤ Anticuerpos y reactivos	
➤ Preparación de la solución de PrP	
➤ Preparación del lisado y corrida electroforética para Western Blot	
➤ Análisis del transporte axonal mitocondrial in vitro	
➤ Análisis estadístico	
RESULTADOS.....	26
➤ PrP induce alteraciones en el transporte axonal rápido de mitocondrias en células de mamíferos.	
➤ La proteína quinasa CK2 media la inhibición de TA inducida por PrP en células de mamíferos	
➤ PrP induce la activación de CK2 promoviendo la fosforilación de la kinesina	
DISCUSIÓN.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXO – INFORMACIÓN Y FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	46

## RESUMEN

Las enfermedades priónicas incluye un número de neuropatías progresivas que involucran cambios conformacionales de la proteína prion celular (PrP<sup>C</sup>) que puede ser esporádica, familiar o infecciosa. Evidencia patológica indica que neuronas que son afectadas con el prion muestran un patrón de degeneración de muerte hacia atrás. Sin embargo, aún no han sido identificados procesos celulares específicos por PrP<sup>C</sup> que expliquen un patrón. Resultados de biología celular en cultivos primarios de neuronas revelan una inhibición del transporte axonal rápido como un efecto tóxico del PrP<sup>C</sup>. Experimentos de biología celular y farmacológicos indican que ese efecto tóxico involucraría la activación de la caseína quinasa 2. Se encontró que la quinasa fosforila e inhibe las subunidades de cadenas livianas de una de las mayores proteínas motoras convencionales, la kinesina. Colectivamente estos datos, sugieren a CK2 como un target terapéutico novedoso para prevenir gradualmente la pérdida y conectividad neuronal que caracteriza la enfermedad de prion.

### Tabla de abreviaturas

TA: transporte axonal

PrP<sup>C</sup>: Proteína prion celular

PrP-FL: Péptido sintético de la proteína prion completa (según sus siglas en inglés)

PrP<sup>Sc</sup>: Proteína Prion scrapie

CJD: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

CK2: Caseína quinasa 2

**Palabras clave:** Enfermedades priónicas, Proteína prion, Transporte axonal, Kinesina, Caseína quinasa 2

# INTRODUCCIÓN

## ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Las enfermedades neurodegenerativas con inicio en la vida adulta involucran la pérdida de las funciones normales y la degeneración de poblaciones neuronales específicas del sistema nervioso central. A pesar de la etiología heterogénea, éstas enfermedades neurodegenerativas comparten ciertas características comunes: son en su mayoría progresivas, en términos generales dependientes de la edad, y su fenotipo clínico resulta de una disfunción sináptica más que de la muerte neuronal, la cual representa un fenómeno muy tardío.

Algunos ejemplos de enfermedades neurodegenerativas progresivas son: la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, y las enfermedades priónicas, entre muchas otras. (Morfini et al., 2009)

## ENFERMEDADES PRIÓNICAS

### Definición

Las enfermedades priónicas involucran a un vasto número de neuropatías que incluye formas esporádicas, familiares, e infecciosas, que afectan a diferentes mamíferos incluyendo a los humanos (Colby et al., 2011). Todas estas neuropatías involucran la conversión estructural y funcional de la proteína prion celular (PrP). La encefalopatía espongiiforme bovina, scrapie en oveja y la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (CJD) en humanos son algunas de las enfermedades priónicas más conocidas. (Prusiner, 1998).

### Reseña Histórica

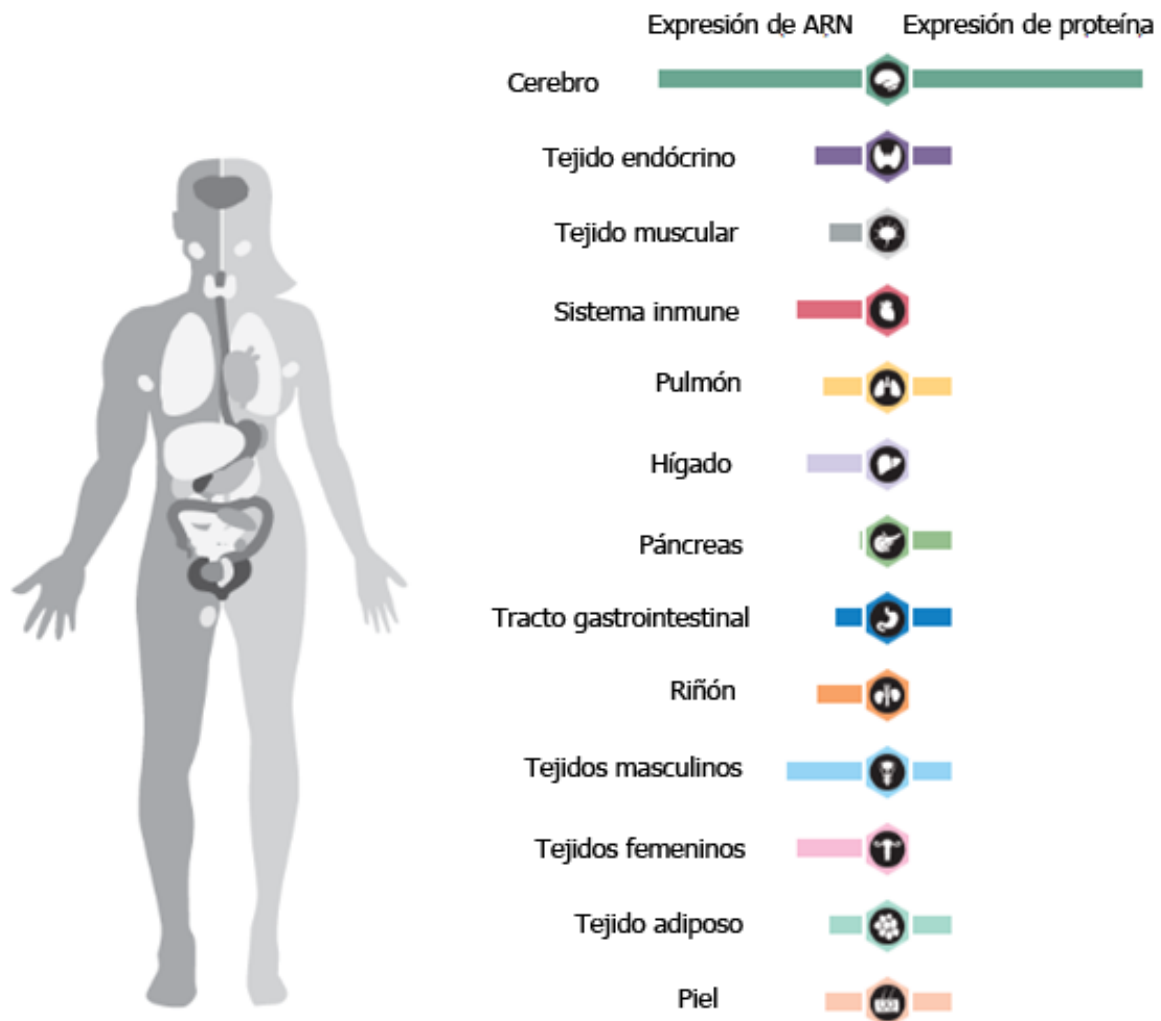
El término “Prion” fue definido en la década del 80 como una partícula infectiva de naturaleza proteica que es resistente a su inactivación por procedimientos que inactivan a los ácidos nucleicos (Prusiner, 1982). Los priones son patógenos infecciosos que causan un grupo de enfermedades neurodegenerativas fatales que presentan un mecanismo molecular patogénico único ya que el patógeno no presenta ácidos nucleicos.

Durante muchos años, CJD fue considerada una enfermedad neurodegenerativa rara de etiología desconocida. Stanley B. Prusiner comienza a interesarse por ésta enfermedad tan particular cuando en 1972 muere un paciente suyo de CJD; el Dr. Prusiner comenzaba su residencia en neurología, y lo que más le impresionó fue ver como el proceso de la enfermedad mataba a su paciente en solo dos meses, destruyendo su cerebro mientras que su cuerpo permanecía sin ser



## Distribución de la proteína prion en el humano

Del análisis de la expresión del ARNm y de la proteína Prion en el cuerpo humano, vemos que si bien se expresa en muchos órganos y tejidos, la mayor expresión se encuentra en el cerebro. Esto también nos motiva a reflexionar por qué mutaciones en el gen que codifica para la proteína prion resultan en enfermedades neurodegenerativas siendo que la expresión del gen está ampliamente expresado en otros tejidos y órganos. Una posible explicación podría ser debido a que existe una mayor expresión en el cerebro. La otra explicación que nuestro laboratorio propone es que la proteína prion también puede regular una función vital neuronal denominada transporte axonal (TA), razón por la cual mutaciones en la proteína prion podrían afectar esta función vital neuronal que podría eventualmente resultar en la disfunción y muerte neuronal.

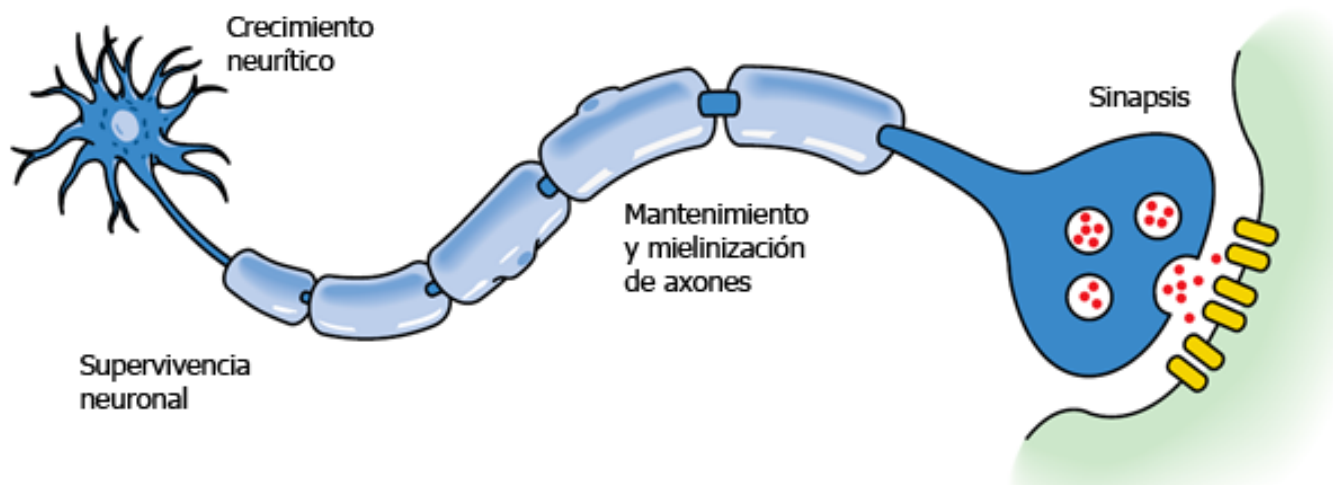


**Figura 2:** Expresión ARN/proteína del prion en el cuerpo humano. (Extraído de The Human Protein Atlas).



### **Función normal de la proteína prion en el sistema nervioso central**

Un extenso cuerpo de información experimental ha determinado que la proteína PrP<sup>C</sup> se encuentra involucrada en numerosos procesos neuronales. Entre ellos se destacan el control del crecimiento neurítico, incluyendo crecimiento de axones y dendritas, (Chen et al., 2003; Kanaani et al., 2005; Lopes et al., 2005; Santuccione et al., 2005). PrP<sup>C</sup> también ha sido reportado como un promotor de la supervivencia neuronal, en particular previene la muerte celular programada o apoptosis y el estrés oxidativo. La proteína prion se encuentra también distribuida en la sinapsis neuronal lugar donde podría participar de numerosas funciones sinápticas. Cabe mencionar que la actividad sináptica es tal vez la primera función neuronal afectada en la enfermedad de prion. Estudios electrofisiológicos, indican que la PrP<sup>C</sup> cumple funciones críticas a nivel sináptico, en particular juega un rol preponderante en la regulación de la liberación de neurotransmisores (Aguzzi et al., 2008) (Figura 3).



**Figura 3. Funciones asociadas a la proteína prion.** Numerosos procesos fisiológicos del sistema nervioso central se encuentran influenciados por la proteína prion celular PrP<sup>C</sup>. El crecimiento neurítico tanto de axones como de dendritas se encuentra reducido en neuronas carentes de PrP<sup>C</sup>. Numerosos reportes demuestran que PrP<sup>C</sup> promueve la supervivencia neuronal, en particular en situaciones de estrés y luego de la inducción de mecanismos apoptóticos. Además, experimentos genéticos con líneas de ratones nulos para PrP<sup>C</sup> muestran una alteración en el mantenimiento de axones mielinizados en la sustancia blanca. Otra función de extrema importancia neuronal de la proteína PrP<sup>C</sup> es la regulación de la formación, mantenimiento y función de los terminales presinápticos. Más aún, experimentos electrofisiológicos demuestran que PrP<sup>C</sup> está directamente involucrado en la liberación de neurotransmisores a nivel sináptico, razón por la cual PrP<sup>C</sup> estaría involucrado en la regulación de la transmisión sináptica. (Extraído de Aguzzi et al. 2008) (Ver información suplementaria)

### Control y mantenimiento de la mielinización axonal

Evidencias histopatológicas han determinado que la proteína PrP<sup>c</sup> juega un rol importante en el proceso de mielinización del sistema nervioso central. Más aún, experimentos bioquímicos demostraron que PrP<sup>c</sup> está presente en fracciones purificadas de mielina derivadas de homogenato de cerebro (Radovanovic, 2005) y que las enfermedades priónicas disminuyen los axones mielinizados de la sustancia blanca del sistema nervioso central (Itoh et al., 1994; Waliś et al., 2003). En este sentido, evidencias genéticas han demostrado que ratones transgénicos con delección de PrP<sup>c</sup> (Baumann et al., 2007; Li et al., 2007; Nishida et al., 1999; Shmerling et al., 1998) muestran vacuolización y degeneración de fibras mielinizadas en el sistema nervioso central.

### Formación y control de la función sináptica

Se ha demostrado que PrP<sup>c</sup> es una importante proteína en la sinapsis, un ejemplo es la transmisión sináptica glutamatergica excitatoria mediada por el receptor GABA<sub>A</sub> que media la inhibición rápida y potenciación a largo plazo, es reducida o ausente en ratones con pérdida de PrP<sup>c</sup> (Carleton et al., 2001; Mallucci, 2002). La idea de PrP<sup>c</sup> de la participación en la formación sináptica se originó de observaciones *in vitro* en neuronas hipocampales, en el cual contactos sinápticos fueron incrementados después de la adición de PrP recombinante (Kanaani et al., 2005). Se ha observado que en la enfermedad de prion ocurren ciertos eventos patológicos tempranos, que involucran pérdida de sinapsis y una progresiva deposición anormal de PrP<sup>sc</sup> en los terminales sinápticos (Grigoriev et al., 1999; Jeffrey et al., 2000; Kitamoto et al., 1992; Matsuda et al., 1999; Roikhel et al., 1983). Cabe mencionar que alguna de estas funciones sinápticas alteradas no fueron corroboradas por otros laboratorios.

### Regulación de la actividad de quinasas

Numerosas evidencias farmacológicas han demostrado que la proteína prion se encuentra involucrada en la regulación de la actividad enzimática de proteínas quinasas (GSK3 $\beta$ , CK2, P38, Fyn, entre otras), enzimas cruciales para diversas funciones neuronales incluyendo el transporte axonal rápido, la estabilidad de espinas dendríticas, y funcionamiento normal de la sinapsis entre otras. (Pérez et al., 2003; Simon et al., 2014; Song et al., 2017). Investigadores del Departamento de Química Biológica de la Universidad de Padova, Italia, han demostrado mediante far-western blot (una técnica que permite ver la interacción proteína-proteína) que la proteína prion

recombinante interactúa fuertemente con la subunidad catalítica  $\alpha$  de la proteína quinasa CK2 (caseína quinasa 2). También observaron que esta interacción incrementa la actividad fosfotransferasa de la CK2. (F Meggio et al., 2000)

Si bien la CK2 es un proteína ubicua, esta es especialmente abundante en el cerebro (Blanquet, 2000). Entonces es posible pensar que el prion celular y la CK2 tienen la oportunidad de ponerse en contacto, especialmente considerando que la CK2 es una de las pocas proteínas quinasas presentes en la lámina exterior de la membrana plasmática, donde PrP también reside (Walter et al., 1996). Estos resultados revelan el potencial de la PrP para modular la actividad de CK2.

Estas quinasas, se conocen que regulan el transporte axonal de las neuronas, un mecanismo importante para el mantenimiento, comunicación y supervivencia de las neuronas. Aún más interesante, desde el punto de vista patológico, resultados de nuestro grupo de trabajo han mostrado que la forma oligomérica del beta amyloide ( $\alpha\text{A}\beta$ ) tiene la capacidad de activar la actividad enzimática de la quinasa CK2 con un perfil de inducción casi idéntico al inducido por la forma oligomérica de la proteína PrP<sup>c</sup> (Pigino et al., 2009).

## **TRANSPORTE AXONAL**

### **Importancia del transporte axonal**

Ermolayev y colaboradores realizaron un análisis de la corteza motora poco antes del inicio de la enfermedad priónica clínica y reveló que más del 80% de las neuronas tenían impedimentos funcionales en el transporte axonal. Esto proporciona evidencia de que la enfermedad priónica está asociada con defectos severos del transporte axonal (Ermolayev, Friedrich, et al., 2009).

Entonces nos podemos preguntar: ¿Por qué es tan importante el transporte axonal para las neuronas?

Para poder responder esa pregunta debemos evaluar el desafío biológico único que experimentan las neuronas. El axón neuronal representa aproximadamente el 99% del volumen de una neurona, y en algunos casos puede tener hasta 1m de longitud (ej, neuronas motoras). Una característica intrigante es que el compartimiento axonal carece de la maquinaria necesaria para sintetizar proteínas de manera efectiva, por ende todas o al menos más del 99 % de las proteínas se sintetizan en el cuerpo celular, se empaquetan en una vesícula de membrana, se asocian a un motor molecular y son transportadas tanto a los axones como a las dendritas (Morfini et al., Libro Basic Neurochemistry). Este suministro es mantenido a lo largo de toda la vida de las

neuronas para proveer materiales estructurales, funcionales y regulatorios a dichos sub-dominios, incluyendo a los terminales sinápticos.

Otra característica única de las neuronas es la extrema polaridad funcional y estructural del compartimiento axonal. El compartimiento axonal presenta un citoesqueleto de microtúbulos que posee una polaridad uniforme, con sus extremos menos (-) localizados próximos al núcleo, y los extremos más (+) que se disponen hacia el terminal presináptico. Esta polaridad estructural le permite al motor molecular kinesina-1 movilizarse únicamente en sentido anterógrado, desde el cuerpo celular al terminal axonal presináptico, y al motor dineína citoplasmática movilizarse en sentido retrogrado desde la sinapsis al cuerpo neuronal (Brady et al., 2012)

Las tres características únicas de los axones: falta de expresión efectiva de proteínas, su extendida longitud, y la extrema polaridad estructural y funcional, juegan un rol clave en la unidireccionalidad del flujo de información, desde el compartimiento somatodendrítico al terminal axonal presináptico. Sin embargo estas propiedades por otro lado dejan a las neuronas extremadamente dependientes del sistema de transporte axonal. Esto sugiere que una falla en el sistema de transporte axonal podría causar defectos tanto estructurales como funcionales potencialmente letal para las neuronas. Cabe mencionar que esta hipótesis fue formulada por Ramón y Cajal desde el principio del siglo XX, pero no fue sino hasta los primeros años del siglo XXI que mutaciones puntuales tanto en kinesina-1 como dineína citoplasmática fueron descubiertas que inducen enfermedades motoras como la paraplejia espástica y degeneración de neuronas motoras (Hafezparast et al., 2003; Reid et al., 2002). Estos datos genéticos claramente sugieren que defectos funcionales en motores moleculares, tanto anterógrado como retrógrado responsables del transporte axonal rápido resultan en enfermedades neurodegenerativas progresivas.

### **Tasas de transporte axonal**

Más tarde se descubrió que existen distintas tasas de transporte, denominándose transporte lento y rápido. En éste último el material transportado se mueve con una tasa de 200-400 mm/día y en el transporte lento a una tasa de 1-2 mm/día. Ambos también difieren en lo que transportan. Estudios de fraccionamiento bioquímico han demostrado que proteínas que se mueven por transporte rápido son predominantemente aquellas asociadas a la membrana, mientras que las proteínas que se mueven por transporte axonal lento se recuperan en fracciones solubles o fracciones citoesqueletales.

¿Si los motores encargados del TA rápido y el TA lento son los mismos, qué factor determina el transporte rápido y el lento? Lo que determina si el transporte es rápido o es lento es el mayor lapso de tiempo de permanencia estática que experimentan los motores cuando movilizan cargos correspondientes al transporte axonal lento, evento que hasta el momento no ha sido totalmente dilucidado.

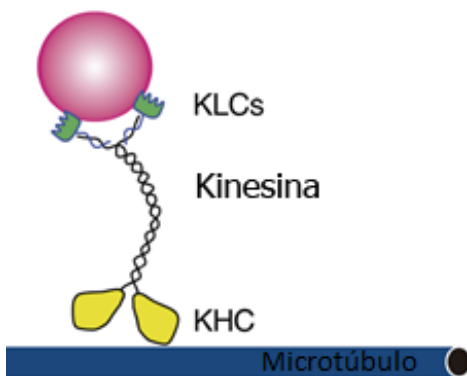
En esta tesis, nos focalizaremos en el TA rápido, debido a la importancia de los materiales que transporta, incluyendo neuropéptidos, enzimas que se asocian a organelas de membrana, neurotransmisores, organelas de membranas como mitocondrias, vesículas sinápticas y endosomas de señalización, entre otros. Cabe mencionar que ambos tiempos de TA son responsables de proveer todos los elementos esenciales para el desarrollo normal tanto de axones como de dendritas, así como del normal funcionamiento y mantenimiento neuronal.

### **Motores moleculares encargados del transporte axonal rápido**

Para finales de la década de los 80, los únicos motores moleculares caracterizados en células de vertebrados eran miosinas musculares y dineínas flagelares. Las propiedades bioquímicas del transporte axonal eran inconsistentes con la miosina y la dineína (Brady, 1991; Brady et al., 1985). Por medio de experimentos farmacológicos y bioquímicos en axones aislados de calamar se pudo determinar que el TA de organelas de membrana debería ser llevado a cabo por un tipo de motor distinto al encargado de la contracción muscular o del batido flagelar. Su descubrimiento surgió de estudios con una forma no hidrolizable del ATP (AMP-PNP), el cual es un inhibidor competitivo de la mayoría de las actividades enzimáticas dependientes de la hidrólisis de ATP. Una característica interesante del nucleótido no hidrolizable AMP-PNP es que posee un efecto inhibitorio muy débil de la actividad ATPasa de los motores moleculares miosina y dineína flagelar. Tomando ventaja de esta propiedad inhibitoria restringida para los dichos motores, se efectuaron experimentos en axoplasmas aislados de calamar con AMP-PNP. Estos experimentos mostraron que la perfusión de AMP-PNP paralizaba por completo el TA (Brady et al., 1985) indicando que en el TA rápido de organelas de membrana debería estar involucrando una nueva clase de motor (mecano-enzima) sensible a dicho análogo. Experimentos bioquímicos de aislamiento basados en el uso de AMP-PNP, y posterior determinación de la secuencia polipeptídica de la nueva mecano-enzima, definió la identidad del nuevo motor molecular anterógrado que fue denominado kinesina (kinesina-1 o kinesina convencional o también Kif 5) (Brady, 1985; Vale et al, 1985).

El motor molecular kinesina (Figura 4) es el más abundante y ampliamente distribuída en células neuronales y no neuronales. Es un heterotetrámero, comprendido por dos cadenas pesadas (KHCs, en amarillo) (115-130 kDa) (Bloom et al., 1988; DeBoer et al., 2008) y dos cadenas livianas (KLCs, en verde) (62 – 70 kDa) (Stenoien et al., 1997). Las cadenas livianas se asocian al extremo carboxilo de las cadenas pesadas y están involucradas en la asociación del motor a las organelas de membrana que transporta, mientras que las cadenas pesadas son las responsables de la hidrólisis del nucleótido ATP, actividad enzimática que reside en su extremo amino terminal. El procesamiento del ATP induce un cambio conformacional de dichas cadenas pesadas induciendo así el movimiento en sentido anterógrado del heterotetrámero. Por otro lado, el extremo amino de las cadenas pesadas también posee la función/capacidad de asociarse a los microtúbulos celulares que sirven como tractos estructurales por donde se desplaza el heterotetrámero transportando sus cargos específicos.

Un extenso cuerpo de evidencias experimentales determinaron que kinesina-1 es el principal y más abundante motor axonal responsable del transporte de organelas de membrana en el sentido anterógrado (Hirokawa et al., 2007; Hirokawa et al., 2003).



**Figura 4:** Esquema de la kinesina. (Extraído de Zamponi et al 2017)

### Mecanismos regulatorios del transporte axonal rápido

Mutaciones tanto en kinesina-1 como en dineína citoplasmática resultan en enfermedades neurodegenerativas progresivas (Hafezparast et al., 2003; Reid et al., 2002). La genética molecular así determina que deficiencias en el TA inducida por mutaciones en los motores que llevan a cabo el transporte, son suficiente para causar una enfermedad neurodegenerativa. Sin embargo en los últimos 20 años, se ha determinado que muchas neuropatías progresivas

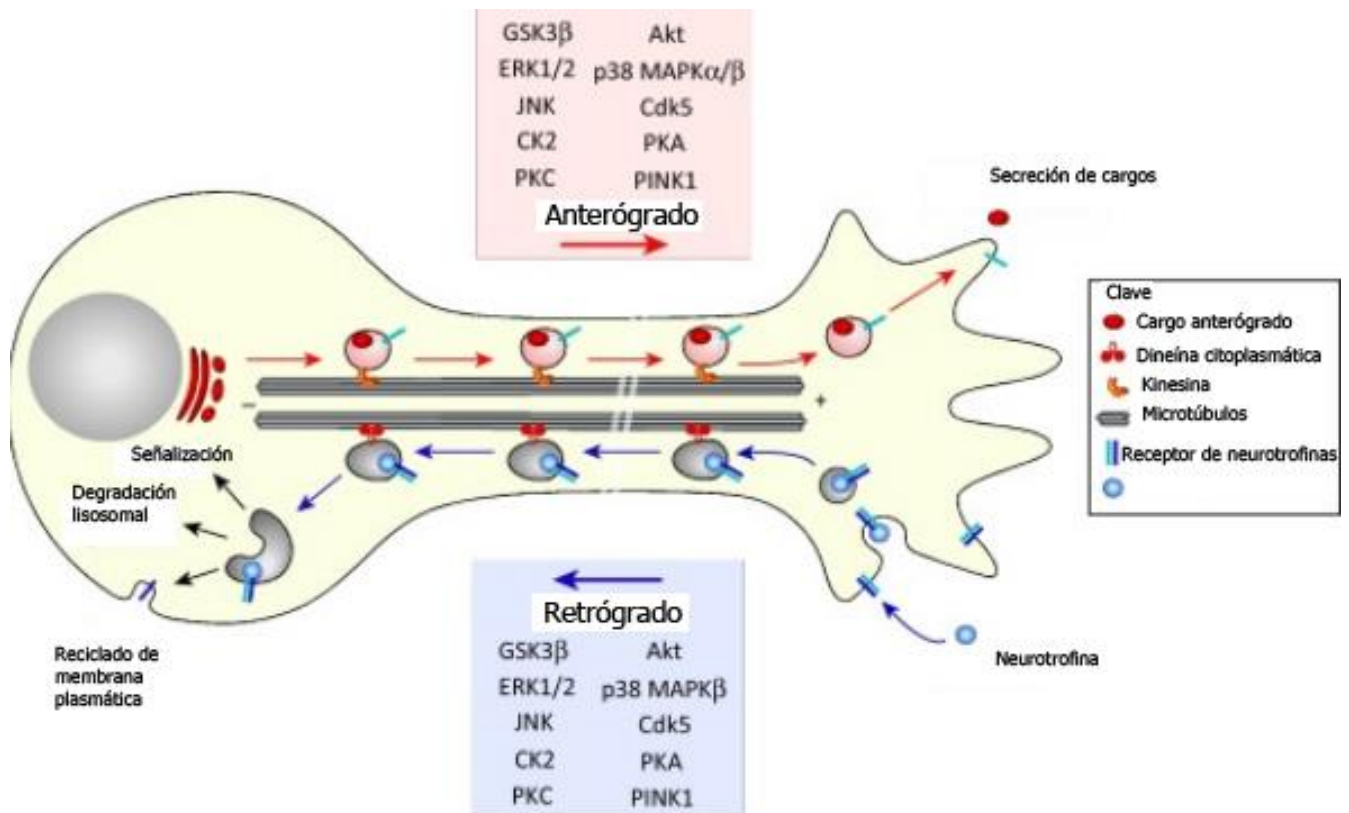
incluyendo las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington y priónicas presentan todas distintas alteraciones en el TA rápido, sin haberse encontrado mutaciones en ningún motor molecular (G. A. Morfini et al., 2009; G. Pigino et al., 2009).

La pregunta siguiente es ¿Cómo se puede explicar molecularmente el defecto en el TA de estas enfermedades sin mutaciones puntuales en los motores moleculares?

Una respuesta a esta pregunta puede encontrarse en el mismo mecanismo regulatorio del TA que involucra actividades enzimáticas específicas, tanto de quinasas como de fosfatasa, en conjunto denominadas fosfotransferasas.

El descubrimiento que el motor molecular kinesina-1 se fosforila *in vivo*, sugirió la posibilidad de que tal vez eventos de fosforilación/desfosforilación podría regular el envío de organelas de membrana en neuronas (Morfini et al., 2002; Morfini et al., 2004). El desafío es determinar cuáles actividades quinasas y fosfatasa son relevantes para dicha regulación (Moreno et al., 2016). El sistema experimental *ex vivo* axoplasma aislado de calamar de nuestro grupo de investigación representa tal vez el modelo más apropiado para estudiar estas vías regulatorias por diferentes razones, primero se puede evaluar el efecto de quinasas individuales en un segmento de axón aislado del cuerpo celular y de su sinapsis, por ende los resultados obtenidos no dependerían ni de la actividad sináptica (por ejemplo bloqueo o activación sináptica, etc), ni de la actividad nuclear (por ejemplo alteración en la síntesis diferencial de proteínas, etc) y segundo se puede agregar las quinasas que uno quiere evaluar su rol regulatorio del TA en concentraciones específicas, así mismo se pueden agregar inhibidores tanto farmacológicos como peptídicos también a concentraciones específicas, y luego evaluar los efectos sobre el TA en tiempo real. Este modelo fue instrumental tanto para el descubrimiento de kinesina-1, como para determinar un número importante de proteínas quinasas responsable de la regulación del TA rápido (Brady et al, 1990; Morfini et al., 2009; Morfini et al., 2009; Morfini et al., 2001)

Dada la extrema complejidad molecular asociada al TA, sabemos que éste posee diversos niveles de regulación, pero quizás el más estudiado hasta la fecha sea el mecanismo regulatorio ejercido por actividades enzimáticas denominadas fosfotransferasas, las cuales incluyen tanto a proteínas serina/treonina/tirosina quinasas, como a proteínas fosfatasa (Figura 5) (Brady et al., 2017; Gibbs et al., 2015).



**Figura 5: Proteínas quinasas implicadas en la regulación del transporte axonal.** La kinesina-1 y la dineína citoplasmática median el transporte de orgánulos, ARN, lípidos y proteínas a lo largo del axón. Las kinesinas median el transporte anterógrado dependiente de los microtúbulos desde el cuerpo celular hasta el terminal sináptico. La dineína se encarga del transporte axonal retrógrado desde el terminal sináptico hacia el cuerpo celular. Tanto el transporte axonal anterógrado como el retrógrado es regulado por varias proteínas quinasas, incluyendo GSK3 (glucógeno sintetasa quinasa 3), ERK 1 /2 (señal extracelular regulada por quinasas 1 y 2), MAPK (quinasas activadas por mitógenos), JNK (quinasas c-Jun N-terminal), Cdk5 (quinasa 5 dependiente de ciclina), PKA (proteína quinasa A), PKC (proteína quinasa C), CK2 (caseína quinasa 2). Los signos (+) y (-) se refieren a la polaridad de los microtúbulos axonal. (Extraído y adaptado de Katherine L. Gibbs et al 2015)

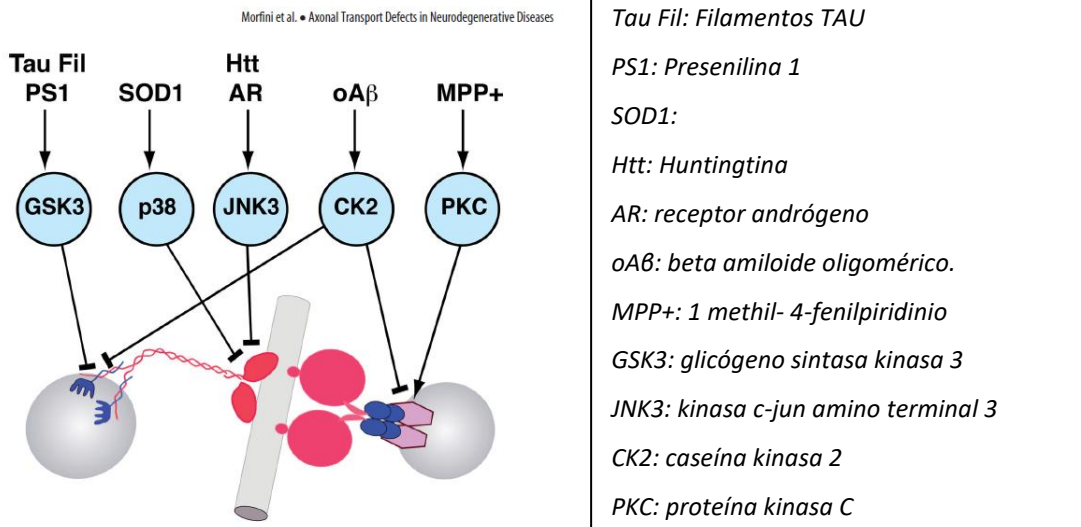
Sea por fosforilación directa o indirecta de residuos aminoacídicos específicos en cada proteína motora, al momento se han determinado diferentes quinasas que pueden modificar actividades no enzimáticas de kinesina-1. Por ejemplo GSK3 $\beta$  inhibe selectiva y específicamente el TA anterógrado mediado por kinesina-1, pero no el TA retrógrado mediado por dineína citoplasmática (Morfini, 2002). Experimentos bioquímicos posteriores determinaron que GSK3 $\beta$  fosforila a las cadenas livianas de kinesina-1 (KLCs) induciendo la liberación del cargo transportado y de esta manera inhibiendo el TA anterógrado. Interesantemente, otra quinasa que ejerce un similar efecto inhibitorio es CK2. La principal diferencia es que CK2 inhibe ambas



direcciones del TA, tanto anterógrado como retrógrado. Sin embargo, experimentos bioquímicos determinaron que al igual que GSK3 $\beta$ , CK2 fosforila a las cadenas livianas de kinesina-1 (KLCs), en diferentes sitios a los fosforilados por GSK3 $\beta$ , y dicho evento induce la liberación de kinesina-1 de la vesícula transportada. La lista de quinasas que regulan el transporte axonal rápido está en una fase crecimiento exponencial. A los propósitos de esta tesis, solo revelamos el efecto molecular de una quinasa reguladora de Kinesina-1 y por lo tanto del TA anterógrado. Para un conocimiento más amplio de proteínas quinasas que posean actividad regulatoria sobre el TA rápido, dirigimos la atención de los lectores a los artículos publicados por los Drs. Scott Brady, Gerardo Morfini, Gustavo Pigino, Giampietro Schiavo y sus grupos de trabajo (Brady et al., 2017; Gibbs et al., 2015; Morfini et al., 2009; Pigino et al., 2009).

### **Proteínas patológicas alteran el TA rápido mediante la activación de proteínas quinasas axonales**

Un extenso cuerpo de investigación experimental ha determinado que numerosas neuropatologías progresivas experimentan alteraciones en las actividades enzimáticas de numerosas fosfotransferasas, actividades que resultan en una fosforilación alterada de proteínas citoesqueléticas, receptoras y motores moleculares, entre muchas otras. Así mismo, se ha reportado que muchas quinasas regulatorias del TA están asociadas a más de una enfermedad neurodegenerativa (Figura 6). En este sentido, y relevante para la enfermedad de Alzheimer, múltiples reportes independientes documentaron alteraciones en las quinasas GSK3 y CK2 (Lazarov et al., 2007; Moreno et al., 2009; Pigino et al., 2003) quinasas que también se encuentran desreguladas en las enfermedades como esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades priónicas. Como resultado uno espera observar cambios en el TA en todas estas enfermedades, y la evidencia disponible valida la predicción (Morfini et al., 2009).



**Figura 6. Defectos en el transporte axonal en enfermedades neurodegenerativas.** El motor de la izquierda es la kinesina, y el de la derecha la dineína. En el círculo celeste se encuentran las quinasas, y se señala el sitio de fosforilación en alguna subunidad de los motores. Allí podemos ver como algunas proteínas, filamentos, oligómeros, etc. descritos como los causantes de ciertas enfermedades (por ejemplo  $\alpha\beta$  de la enfermedad del Alzheimer) desregula la actividad de la CK2, y ésta produce la inactivación de ciertas subunidades en la kinesina y dineína, desregulando así el transporte axonal. (extraído de Morfina et al 2009)

El patrón de degeneración de muerte hacia atrás observado en neuronas afectadas por la enfermedad del prion sugieren fuertemente que la forma patogénica del prion podría interferir con procesos celulares relevantes para el mantenimiento de la conectividad neuronal, como el transporte axonal rápido (Blackstone et al., 2011; Reid et al., 2002). Se sabe que las neuronas son las únicas células que dependen de TA para el correcto funcionamiento neuronal y su supervivencia. La importancia del transporte axonal ha sido puesto de manifiesto por numerosos reportes genéticos, los cuales determinaron que mutaciones funcionales en motores moleculares, tanto en kinesina como en dineína, resultan en neuropatías progresivas como la paraplejia espástica y distintas disfunciones motoras (Blackstone et al., 2011; Hafezparast et al., 2003; Puls et al., 2005; Reid et al., 2002). Análisis microscópicos documentaron déficits en TA anterógrado y retrógrado en ratones inoculados con PrP<sup>Sc</sup> concurrente con el desarrollo y con los síntomas de la enfermedad de prion (Ermolayev, Friedrich, et al., 2009). Una gran evidencia indica que varias proteínas mal plegadas neuropatológicas comprometen TA por alteraciones en la actividad de proteínas quinasas involucradas en la regulación de proteínas motoras (Gibbs et al., 2015; Morfina et al., 2009; Pigino et al., 2009). Además varias quinasas que afectan TA, han sido reportadas como desreguladas en la enfermedad de prion, incluyendo GSK3 (Pérez et al., 2003),

PI3K (Simon et al., 2014), JNK (Carimalo et al., 2005) y Caseína Kinasa 2 (CK2) (Chen et al., 2008; Meggio et al., 2000).

Nuestro equipo de trabajo demostró previamente mediante ensayos de motilidad vesicular en axoplasmas aislados de calamar, que la proteína PrP<sup>c</sup> entera, cuya secuencia de aminoácidos involucra los aminoácidos 23-230 (PrP-FL), induce una reducción del TA rápido en ambas direcciones, tanto anterógrado como retrógrado (Zamponi et al., 2017). Allí surge la pregunta sobre que dominio/s de la proteína PrP<sup>c</sup> son responsable/s de dicha inhibición del TA.

Se sabía por experimentos previos que el dominio central (CD, aminoácidos 90-130) juega un rol clave en la toxicidad de PrP<sup>c</sup>, por ende decidimos utilizar el péptido neurotóxico de 21 aminoácidos PrP<sub>106-126</sub> para ver si alteraba el TA. Resultados del grupo colaborador muestran que el péptido PrP<sub>106-126</sub> indujo una reducción del TA con un perfil inhibitorio casi idéntico al inducido por PrP-FL, mientras que el péptido control PrP-Scram, que contiene los mismos aminoácidos que PrP<sub>106-126</sub>, pero cuya secuencia de aminoácidos están ordenados al azar, no muestran ningún efecto en el TA. Esto les permitió hipotetizar entonces que eliminando el dominio central (CD) de la proteína entera (PrP-ΔCD) se eliminaría el efecto inhibitorio sobre el TA de PrP-FL. Cuando perfundieron el mutante que no posee el dominio central PrP-ΔCD el TA se mantuvo inalterado, sugiriendo de esta manera que el CD es suficiente y necesario para causar inhibición del TA. (Ver figura suplementaria 1)

En modelos de invertebrados (axoplasma de calamar) se ha demostrado que la caseína quinasa 2 (CK2) inhibe el transporte axonal anterógrado rápido, a través de la fosforilación directa de la kinesina y la reducción de su afinidad por los cargos vesiculares (Pigino et al., 2009), resultados obtenidos por nuestro grupo colaborador del Departamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Illinois en Chicago, Chicago Illinois, Estados Unidos y del Laboratorio Biológico Marino, Woods Hole, Massachusetts, Estados Unidos. Sin embargo estos resultados no se han confirmado en neuronas de mamíferos.

En base a los resultados de nuestro grupo colaborador y a todos los antecedentes presentados nos planteamos la siguiente **hipótesis de trabajo:**

***“La proteína prion inhibe el TA de organelas de membrana tanto anterógrado como retrógrado mediante la activación enzimática de la quinasa CK2”***

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo a largo plazo es determinar el mecanismo molecular que subyace a la inhibición del TA mediado por la proteína prion celular (PrP<sup>c</sup>). Evidencias experimentales obtenidas de nuestra propuesta pueden sentar las bases moleculares para desarrollar una estrategia farmacológica, que permita enlentecer o frenar la disfunción neuronal y posterior pérdida de conectividad sináptica en enfermedades priónicas y otras con similar mecanismo patológico.

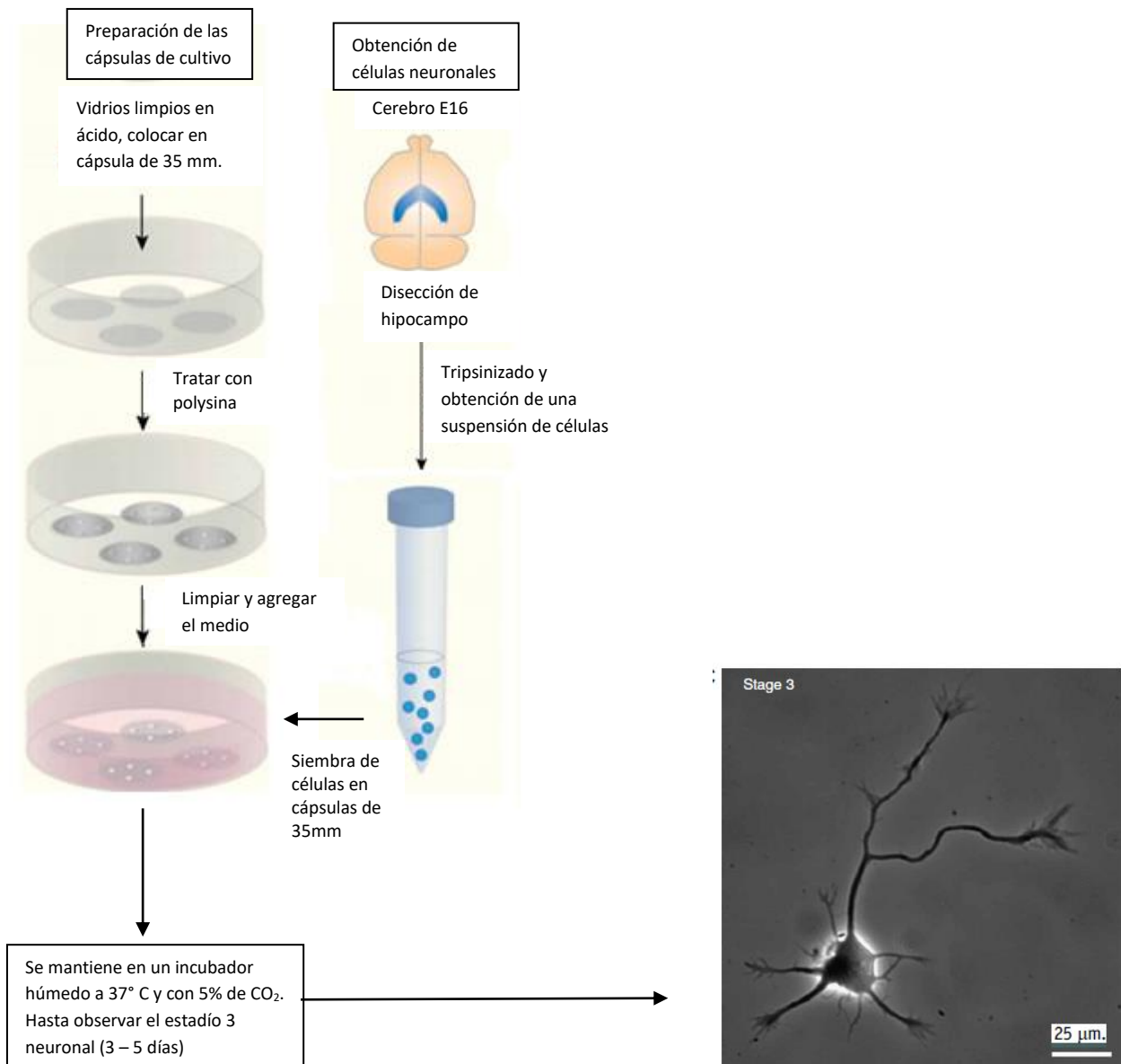
## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Determinar si la proteína prion inhibe el transporte axonal de mitocondrias en células de mamíferos.*
  
- 2) Determinar si la inhibición del transporte axonal mitocondrial depende de la activación de la caseína quinasa 2 (CK2)*

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivo celular.** Cultivos de neuronas de hipocampo fueron realizados como hemos realizado anteriormente (Pigino et al., 2003) que es una modificación del cultivo primario que se efectúa en el laboratorio del Dr. Gari Banker (Banker et al., 2006). El cultivo se realiza a partir de embriones de 16 días de gestación (E16). Las ratas madres fueron sacrificadas, los embriones removidos de los úteros y colocadas en una cápsula de Petri estéril. Luego, fueron decapitados y las cabezas colocadas en cápsulas estériles que contenían buffer HANK (CINa 0,8 mg %, ClK 40mg %,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6,21mg %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6 mg %). Posteriormente se procedió a disecar el hipocampo o corteza, procedimiento que se realizó bajo observación microscópica, mediante el empleo de instrumental quirúrgico para micro-disección.

El tejido nervioso así obtenido fue colectado en tubos estériles (Figura 7) e incubados durante 16 minutos en una solución de tripsina 0,25%/HANK's a 37°C en un baño termostatzado para producir la disociación celular. Luego, se lavó la solución de tripsina mediante 3 lavados con una solución de HANK's. Finalmente, el tejido tripsinizado fue disociado mecánicamente mediante el uso de una pipeta Pasteur de punta fina. La suspensión celular así obtenida, fue sembrada sobre vidrios de 12 milímetros de diámetro, previamente tratados con poli-L-lisina (1mg/ml en buffer borato pH 7,4) (Sigma Ch. co). Las células fueron sembradas en una densidad baja de aproximadamente 175.000 células en cápsulas de 35 mm para inmunocitoquímica, o una densidad alta de 500.000 células en cápsulas de 35 mm para análisis bioquímico y mantenidas en medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagles médium DMEM) suplementado con 10% de suero de caballo (Gibco), Penicilina/Estreptomicina 100µg/ml, Glutamina 2mM y Piruvato 11 mg % por 2 horas. Posteriormente, se reemplaza el medio de sembrado por el medio de mantenimiento libre de suero, Neurobasal suplementado con B27 Penicilina/Estreptomicina 100µg/ml y Glutamina 2mM (Gibco). Todos los cultivos fueron mantenidos en un incubador húmedo a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>, durante 3-5 días.

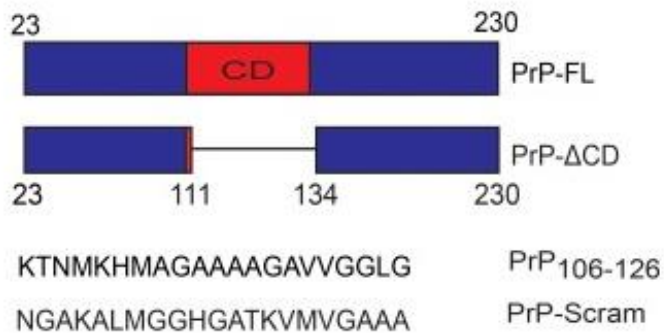


**Figura 7:** Esquema de cultivo celular (Modificado de Banker et al 2006).

**Anticuerpos y reactivos.** Se utilizaron los siguientes anticuerpos: Anticuerpo monoclonal contra las cadenas livianas de la kinesina 1 (KLCs) (Ab-63-90) (Stenoien & Brady, 1997) anticuerpo monoclonal contra las cadenas pesadas de la kinesina 1 (Ab-H2) anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ -tubulina clase III. Inhibidor de la proteína caseína quinasa 2 (CK2) TBCA, obtenido de Calbiochem, diluido en DMSO y guardado a -20°C hasta su uso.

**Preparación de la solución de PrP.** Péptidos sintéticos de 21 aminoácidos correspondientes a la proteína PrP<sup>c</sup> humana (Figura 8) fueron sintetizados en la Universidad de Illinois en la

ciudad de Chicago (Research Resources Center). Los péptidos de PrP empleados fueron: PrP<sub>106-126</sub> y PrP<sub>106-126</sub> scrambled (PrP-Scram, constituido por los mismos aminoácidos que en PrP<sub>106-126</sub> pero en un orden mezclado al azar). Los péptidos sintéticos liofilizados se reconstituyeron en agua desionizada libre de nucleasas a 4°C a una concentración final de 1 mM (solución stock) por alícuota. Antes de utilizar los péptidos, cada alícuota fue calentada a 37 °C por 60 minutos antes de ser utilizados.

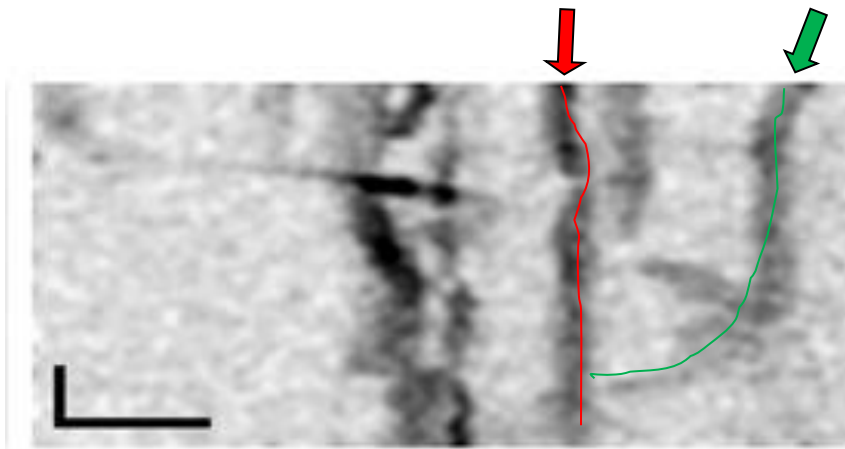


**Figura 8: Péptidos sintéticos.** PrP-FL corresponde a la proteína entera, en rojo está marcado una zona conocida como dominio central (CD) que corresponde a 20 aminoácidos. PrP- ΔCD es la proteína entera quitándole ese dominio central. PrP 106-126 es la proteína prion con sólo los 20 aminoácidos del dominio central, y por último PrP-Scram son los mismos 20 aminoácidos que PrP 106-126 pero mezclados al azar. (Extraído de Zamponi et al. 2017)(Ver información suplementaria)

**Preparación del lisado y corrida electroforética para Western Blot.** El cultivo de células fue homogeneizado en buffer ROLB y las proteínas fueron separadas por corrida electroforética en geles de acrilamida de 10% y transferidas a membranas de polyvinylidene fluoride (PVDF) como se describió anteriormente (Pigino et al., 2001)

**Análisis del transporte axonal mitocondrial in vitro.** Neuronas hipocampales cultivadas por 2 días fueron transfectadas (Lipofectamine 2000, Invitrogen) con un plásmido que codifica la proteína amarilla fluorescente unida a una proteína residente de mitocondrias (mitoYFP, OriGene) para permitir la visualización in vivo de la organela a estudiar. Al día siguiente de la transfección, los cultivos fueron tratados con PrP<sub>106-126</sub> /PrP-Scram por una hora y luego puestos en una cámara de video a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con medio Neurobasal libre de rojo fenol (Gibco). Se tomaron una serie continua de imágenes de la mitocondria axonal a intervalos muy cortos de tiempo, y fueron adquiridos en un microscopio invertido

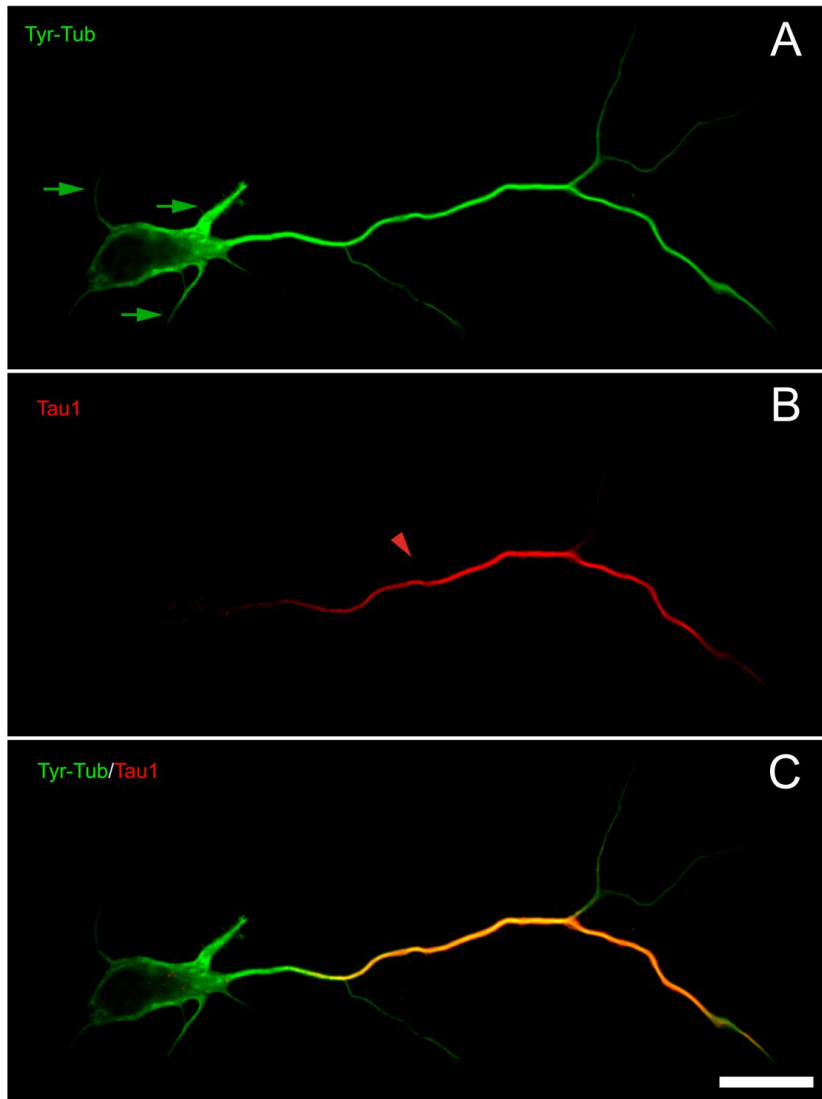
Olympus IX81 equipado con DSU, iluminación epifluorescente (150 W lámpara de Xenon) y un microprocesador. La adquisición de imágenes fue tomada con un objetivo de inmersión de aceite de 60X asociada a una cámara CCD ORCA AG (Hamamatsu). La serie de imágenes a intervalos muy cortos de tiempo (1 cuadro por cada 3 segundos) se grabaron durante 10 minutos. El movimiento de la mitocondria se analizó visualmente con Multi Kymograph un plugin de Fiji (<http://fiji.sc/>) contando la proporción y dirección de las mitocondrias que se mueven por más de 3  $\mu\text{m}$  sobre un segmento axonal de 30  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura 9). Este complemento de Kymograph para ImageJ está diseñado para medir las velocidades de las estructuras en movimiento en una serie de tiempo de imagen.



**Figura 9: Kimogramas.** Plot tiempo-espacio. En el eje de las X se encuentra la distancia ( $\mu\text{m}$ ) y en el eje de las Y el tiempo (segundos). Por ejemplo la flecha verde marca una mitocondria que se está moviendo en el tiempo, y la flecha roja, una mitocondria que se encuentra en el mismo lugar al pasar el tiempo. (Se dibujó una línea con el color respectivo sobre el kimograma para poder visualizar mejor su movimiento, y su entendimiento)

Se consideran axones, al mayor proceso o aquellos procesos que tienen al menos 40-50  $\mu\text{m}$  de largo. Típicamente los axones que medimos tienen entre 120-150  $\mu\text{m}$  de largo. Para confirmar la identidad del proceso axonal se tiñeron neuronas hipocámpales de 3DIV con un anticuerpo contra una proteína residente axonal Tau ( $\tau$ -1) y alfa tubulina (Figura 10). Los datos corresponden a 3 experimentos independientes por condición.





**Figura 10:** Proceso axonal en neurona hipocámpal de 3 DIV. En flechas verdes se marca los procesos, y la flecha roja marca el proceso axonal. La figura C muestra la colocalización de Tyr-Tub/Tau 1 en la neurona. Barra de escala 20 $\mu$ m.

### Análisis estadístico

La comparación estadística fue obtenida usando el software GraphPad Prism. Todos los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces, usando cultivos celulares derivados de embriones de al menos 3 ratas diferentes. La diferencia fue considerada significativa con un p mayor o igual a 0.05. Comparaciones múltiples fueron realizadas usando ANOVA a un

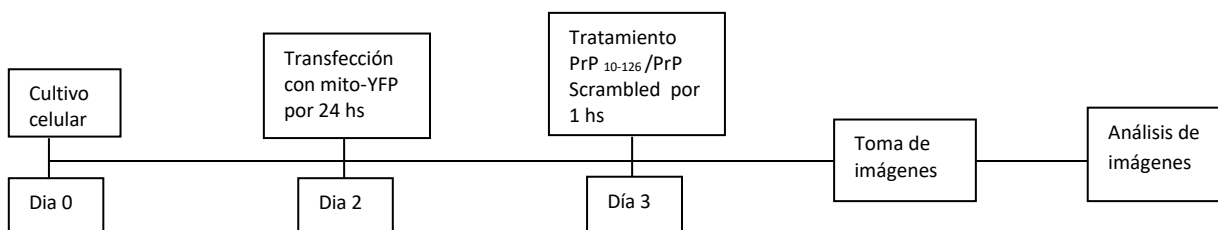
factor con test de Tukey post-hoc. Para comparaciones de a pares se usó el test de t de Student.

## RESULTADOS

### PrP induce alteraciones en el transporte axonal rápido de mitocondrias en células de mamíferos.

Basados en los resultados obtenidos en axones aislados de calamar, decidimos evaluar el efecto de PrP<sub>106-126</sub> en el TA de organelas de membrana en células de mamífero. Para ello evaluamos el TA de mitocondrias, organelas que son movilizadas a lo largo del axón tanto por dineína en sentido retrógrado, como por kinesina-1 en sentido anterógrado.

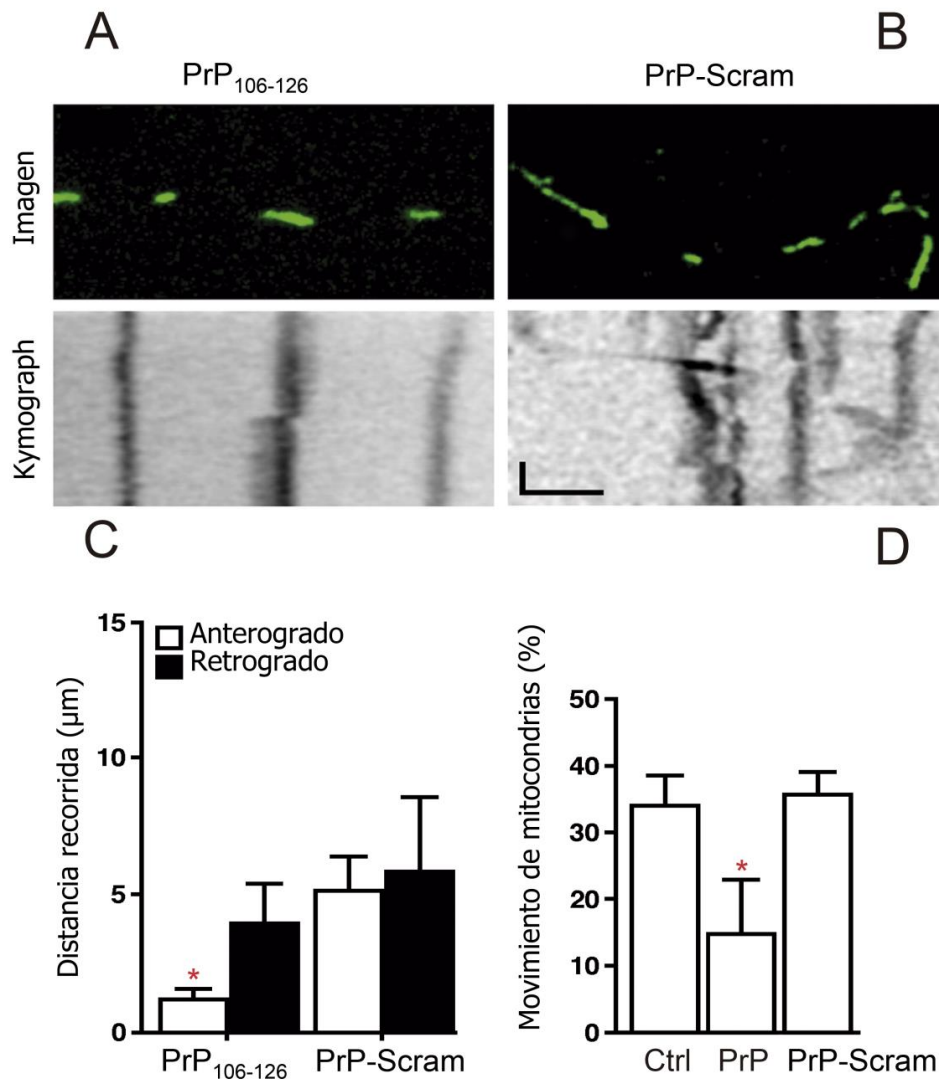
Si marcábamos la mitocondria con Mito Tracker Red podía interferir con la movilidad mitocondrial (Buckman et al., 2001; Xinnan Wang & Schwarz, 2009), por esto transfectamos neuronas hipocampales de embriones en un cultivo primario con un plásmido que codifica una proteína mitocondrial residente fusionada con una proteína fluorescente amarilla (mito-YFP) (Fig. 11). A los 3 días in vitro (3 DIV), incubamos las neuronas transfectadas por una hora con 3  $\mu$ M PrP<sub>106-126</sub> (Fig. 12A) o con el control PrP- Scram (Fig. 12B), y analizamos la motilidad mitocondrial por 10 minutos usando microscopía time-lapse.



**Figura 11:** Esquema de transfección del cultivo celular con mito-YFP.

Consistente con la reducción marcada de TA observada en los axoplasmas tratados con el péptido PrP<sub>106-126</sub> (Fig. suplementaria 1), el análisis del TA mitocondrial representado en el kimograma reveló una reducción de la motilidad mitocondrial en neuronas tratadas con PrP<sub>106-126</sub> (Fig 12A), comparadas con neuronas tratadas con PrP-Scram (Fig. 12B). Específicamente, el promedio de distancia recorrida en dirección anterógrado fue significativamente reducida en PrP<sub>106-126</sub> ( $1.22 \pm 0.33 \mu\text{m}$ ) comparado con las células tratadas con PrP-Scram ( $5.17 \pm 1.23 \mu\text{m}$ ) (Fig. 12C). Algo

similar ocurrió con la motilidad mitocondrial, el promedio fue significativamente reducido en PrP<sub>106-126</sub> ( $14.79 \pm 8.05$ ) versus células tratadas con PrP Scram ( $35.56 \pm 3.32$ ) o células control no tratadas ( $35.88 \pm 4.47$ ) (Fig. 12D). Estos resultados permitieron determinar que el PrP<sub>106-126</sub> induce una reducción del TA comparable en los dos modelos experimentales, sugiriendo que el mecanismo inhibitorio del dominio central de PrP<sup>c</sup> esta conservado desde los cefalópodos a los mamíferos.



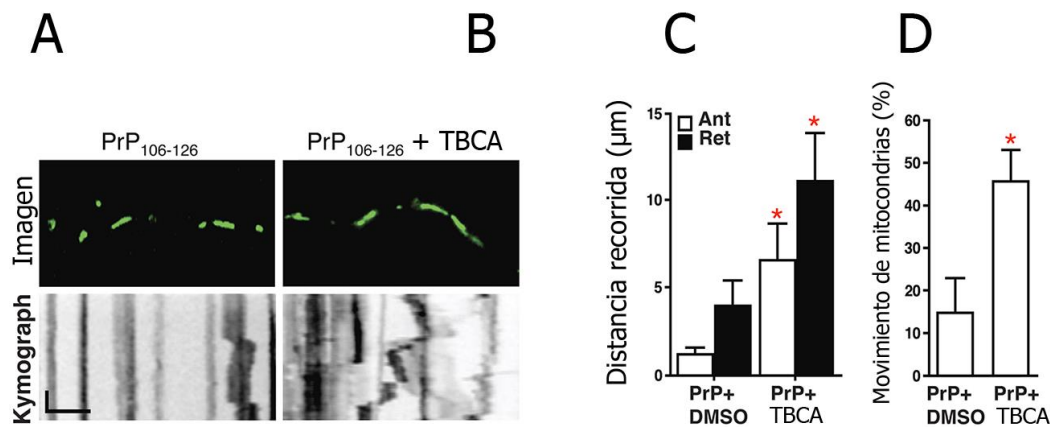
**Figura 12. Prion inhibe el transporte axonal rápido de la mitocondria en cultivo de neuronas de mamíferos.**

Los efectos del Prion en la movilidad mitocondrial en cultivos primarios de neuronas hipocámpales de embrión de rata de 3 días in vitro. (A) El panel superior muestra las mitocondrias marcadas fluorescentemente de los axones de neuronas tratadas con PrP<sub>106-126</sub> o el control (B) PrP<sub>106-126</sub> Scram. En el panel inferior, el kymograma revela la

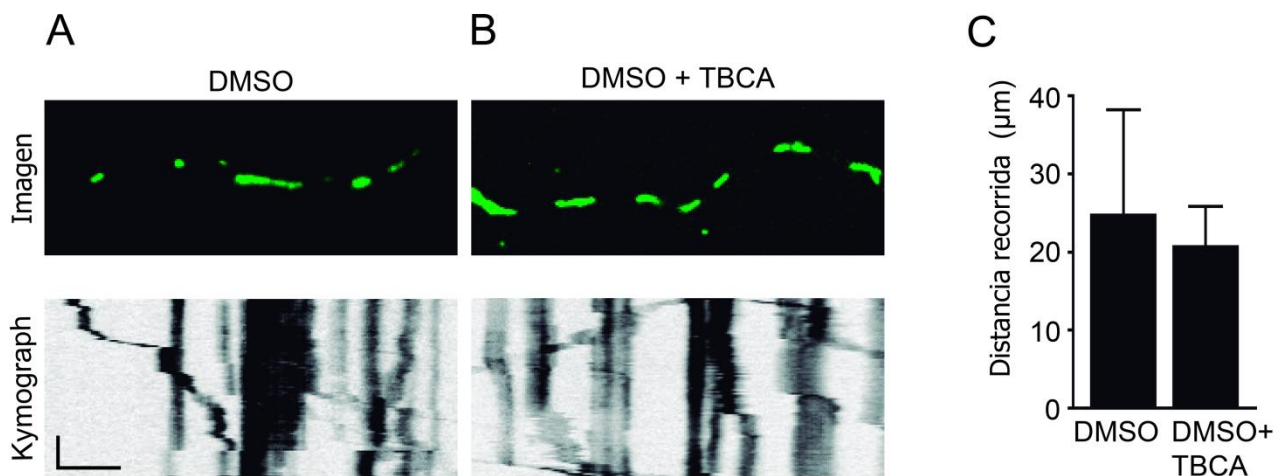
trayectoria de la movilidad de la mitocondria de neuronas incubadas por una hora con 3  $\mu\text{M}$  PrP<sub>106-126</sub> versus PrP<sub>106-126</sub> Scram (**B**). Los kimogramas fueron obtenidos de imágenes del panel superior. La barra en el eje de las X equivale a 30  $\mu\text{m}$  y en el eje de las Y equivale a 60 segundos. (**C**) Cuantificación de la distancia recorrida por las mitocondrias en **A** y **B** se analizó en dirección anterógrado (blanco) y retrógrado (negro). (**D**) Cuantificación del porcentaje de mitocondrias en movimiento en neuronas tratadas con 3  $\mu\text{M}$  PrP<sub>106-126</sub> comparado con PrP<sub>106-126</sub> Scram, o neuronas control no tratadas (Ctrl). Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por ANOVA con prueba post-hoc Tukey

### **La proteína quinasa CK2 media la inhibición de TA inducida por PrP en células de mamíferos.**

Varias fosfotransferasas han sido identificadas que regulan el TA rápido mediante la fosforilación de subunidades específicas de proteínas motoras responsables del TA. (Blasier et al., 2014; Morfini, 2002; Morfini et al., 2004). Una gran cantidad de proteínas quinasas fueron probadas en preparaciones de axoplasma de calamar, entre ellas la caseína quinasa 2 (CK2) la cual inhibió TA rápido con un perfil inhibitorio similar al inducido por PrP-FL o PrP<sub>106-126</sub> (Fig S2) (Reid et al., 2002); estos resultados nos motivaron a evaluar si PrP<sub>106-126</sub> inhibe el TA en células de mamíferos, y si esa inhibición es dependiente de CK2. Para ello, incubamos neuronas en cultivo con PrP<sub>106-126</sub> (Fig. 13A) más el inhibidor específico de CK2 (Pagano et al., 2007): TBCA (ácido tetrabromocinámico) (2  $\mu\text{M}$ ; Fig. 13B) Luego evaluamos la motilidad mitocondrial por microscopía. El análisis del kimograma muestra un incremento consistente de la motilidad mitocondrial para neuronas co-incubadas con PrP<sub>106-126</sub> más TBCA (Fig 13B panel inferior) comparadas con neuronas tratadas con PrP<sub>106-126</sub> y el vehículo DMSO (Fig. 13A panel inferior). Como se esperaba, neuronas tratadas con TBCA solo, no alteraron la motilidad mitocondrial (Fig. 14) Análisis cuantitativo confirmó que el promedio de distancias recorridas por una mitocondria individual en la dirección anterógrada ( $6,56 \pm 2.09 \mu\text{m}$ ) o retrógrado ( $11.05 \pm 2.74 \mu\text{m}$ ) fue significativamente más alta en neuronas co-tratadas con TBCA comparada con las distancias promedios de mitocondrias individuales de neuronas tratadas con PrP<sub>106-126</sub> (anterógrado:  $1.21 \pm 0.38 \mu\text{m}$ ; retrógrado  $3.97 \pm 1.44 \mu\text{m}$ ) (Fig. 13C). El promedio de mitocondrias en movimiento (Fig. 13D) fue significativamente más alta en neuronas tratadas con PrP<sub>106-126</sub> + TBCA ( $45.51 \pm 7.29$ ) que en neuronas tratadas con PrP<sub>106-126</sub> ( $14.72 \pm 8.17$ ). Estos resultados muestran que PrP<sub>106-126</sub> presenta un efecto inhibitorio del TA en células de mamíferos y que dicha inhibición es mediada por la actividad de la quinasa CK2. Interesantemente, estos resultados fueron consistentes con información anterior que muestran la interacción de PrP con CK2 y la modulación de esta actividad (Blackstone et al., 2011; Levy et al., 2006).



**Figura 13: Caseína quinasa 2 media la inhibición del transporte axonal rápido inducida por PrP.** (A) el panel superior muestra la mitocondria marcada fluorescentemente en el axón de neuronas de 3 DIV tratadas con PrP<sub>106-126</sub>. En el panel inferior el kimograma revela la trayectoria de la mitocondria de las neuronas incubadas con 3 μM de PrP<sub>106-126</sub> o (B) PrP<sub>106-126</sub> más 2 μM TBCA por 1 hora. (C) Cuantificación del promedio de distancia recorrida por la mitocondria analizada en (A) y (B) en anterógrado (blanco) y retrógrado (negro). Nótese la pérdida del efecto inhibitorio cuando las neuronas son co-incubadas con 2 μM TBCA. (D) Cuantificación del porcentaje de mitocondrias en movimiento analizadas en (A) o (B). Nótese la reducción del movimiento de mitocondrias en PrP<sub>106-126</sub> y la dramática recuperación de la motilidad mitocondrial en PrP<sub>106-126</sub> con 2 μM TBCA en neuronas co-tratadas. Estos resultados farmacológicos sugieren que la activación axonal endógena de CK2 puede ser el responsable de la inhibición de ambas direcciones de FAT inducidas por PrP celular. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes.



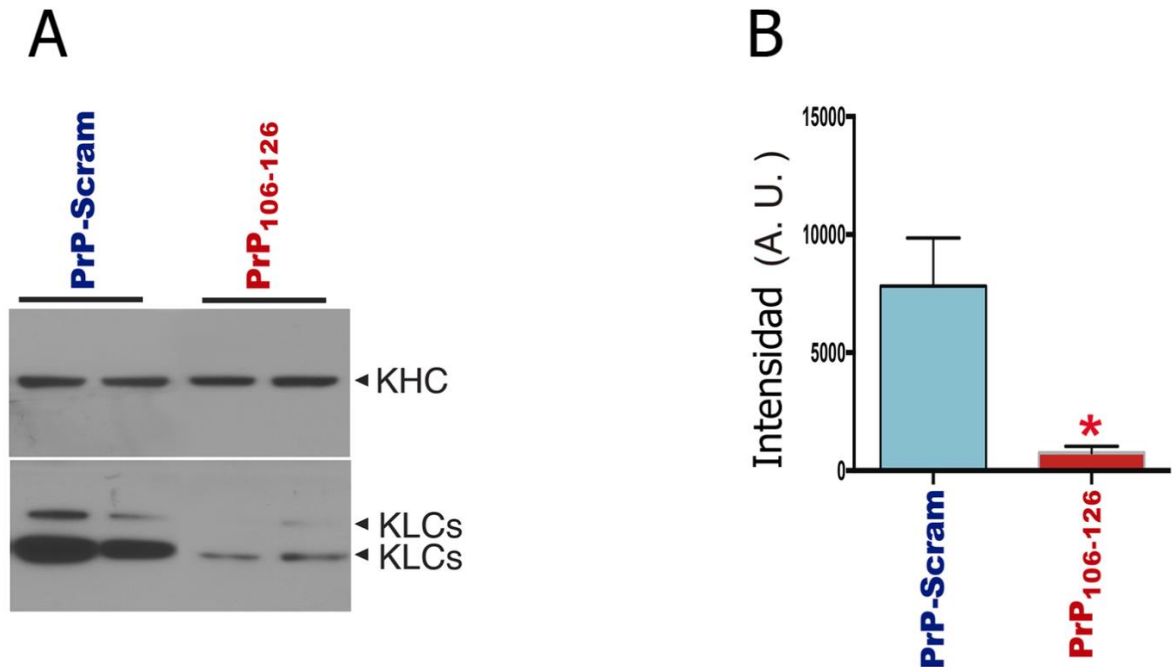
**Figura 14: El inhibidor TBCA no altera TA.** El panel superior muestra la mitocondria marcada fluorescentemente en axones de neuronas de 3 DIV tratada con el vehículo (DMSO) o el inhibidor de la CK2 TBCA 2 μM por 60 minutos. En el panel inferior, los kimogramas muestran la trayectoria de la movilidad mitocondrial de neuronas incubadas con vehículo (A) o 2 μM TBCA por una hora (B). (C) Cuantificación de la distancia promedio

en movimiento de la mitocondria analizada en (A)  $24.88 \pm 13.47 \mu\text{m}$  y (B)  $20.76 \pm 5.16 \mu\text{m}$  en dirección retrógrada. La barra escala en el eje de las X mide  $30 \mu\text{m}$  y en el eje de la Y equivale a 60 segundos. Fueron analizadas un total de 19 neuronas, 8 (control DMSO) y 11 (tratadas con DMSO y TBCA). Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes.

### **PrP induce la activación de CK2 promoviendo la fosforilación de la kinesina**

Experimentos bioquímicos previos demostraron que CK2 fosforila directamente las subunidades de cadenas livianas de la kinesina-1 (KLCs) (Karki et al., 1997; Morfini et al., 2001; Reid et al., 2002; Schäfer et al, 2008). Basados en éstos precedentes y en los resultados de nuestro grupo colaborador en el cual coperefunden los péptidos junto a su inhibidor específico (Fig. Suplementaria 2), se evaluó si la toxicidad de PrP podría inducir la fosforilación de KLCs de una manera alterada. Para éste fin se incubaron neuronas de hipocampos con PrP<sub>106-126</sub> y PrP Scram por una hora (Fig 15A y 15B). La fosforilación de la subunidad de KLCs fue evaluada por Western Blot. Empleamos un anticuerpo monoclonal denominado 63-90, que reconoce preferentemente epítopes con consenso para CK2 desfosforilados en las cadenas livianas de Kinesina-1 (KLCs) (Reid et al., 2002; Stenoien & Brady, 1997). Observamos una significativa reducción en la inmunoreactividad del anticuerpo 63-90 en el cultivo de neuronas tratadas con PrP<sub>106-126</sub> versus el péptido control (Fig 15A). Una evaluación semicuantitativa determinó una reducción de aproximadamente 90% en la inmunoreactividad para el anticuerpo 63-90 en células tratadas con PrP<sub>106-126</sub> versus el péptido control PrP-Scram (Fig. 15B). Como control de la cantidad de proteína total evaluada por Western blot en cada situación experimental, utilizamos un anticuerpo primario que reconoce a las cadenas pesadas de Kinesina-1 (KHCs) denominado H2, el cual es independiente del nivel o grado de fosforilación de kinesina-1.

Estos resultados nos sugieren fuertemente, que las neuronas responden a la incubación con PrP<sub>106-126</sub> con una anormal fosforilación de las KLCs por parte de CK2 endógena.



**Figura 15: PrP induce la fosforilación de la subunidad de cadenas livianas de la kinesina mediante CK2.**

(A) Análisis por Western blot del nivel de fosforilación de las KLCs, en neuronas de embriones de rata cultivadas por 3 días *in vitro* y tratadas por una hora con PrP<sub>106-126</sub> o PrP-Scram. El anticuerpo 63-90 reconoce KLCs desfosforilada. (Ermolayev et al., 2009; Reid et al., 2002). (B) El gráfico muestra una cuantificación semicuantitativa de los valores de A, en donde observamos que las neuronas tratadas con PrP<sub>106-126</sub> disminuye la inmunoreactividad para el anticuerpo 63-90 versus las células tratadas con el péptido control PrP-Scram.

## DISCUSIÓN

Aún después de décadas de investigación la base molecular de la patología de la enfermedad de prion permanece incierta. A pesar de que la forma infecciosa de la enfermedad de prion ha recibido la mayor atención (Westergard et al, 2011) la infección de prion es menos frecuente en humanos. La mayoría de casos humanos (99%) son asociados con mutaciones en el gen que codifica PrP<sup>c</sup> que ocurren esporádicamente (Chiesa, 2015). En casos donde la conformación de PrP<sup>sc</sup> no es requerida para inducir la patogénesis, estudios genéticos y experimentales sugieren que la agregación del prion mutante o salvaje puede inducir mal funcionamiento neuronal y toxicidad (Chiesa, 2015; Chiesa et al., 2016; Diack et al., 2014; Tateishi & Kitamoto, 1995). Numerosas evidencias experimentales demostraron que péptidos agregados de la proteína PrP<sup>c</sup> con estructura oligomérica (oPrP<sup>c</sup>) inducen neurotoxicidad sin involucrar a la estructura tóxica e infecciosa PrP<sup>sc</sup> (Chiesa et al., 2008; Chiesa, 2015; Chiesa & Harris, 2001; Simoneau et al.,

2007). Análisis estructural de PrP-FL y PrP<sup>106-126</sup> realizado por microscopía de fuerza atómica indica que ambos constructos de PrP presentan una conformación globular u oligomérico (Fig. Suplementaria 3). Interesantemente, el Dr Chiesa y colaboradores demostraron que sobreexpresando el PrP salvaje pueden causar mal funcionamiento neuronal y anormalidades sinápticas a través de especies de PrP agregadas no infecciosas (Chiesa et al., 2008).

Resultados de varios laboratorios indican que la acumulación citosólica de PrP celular full-length (la proteína completa) es suficiente para inducir toxicidad neuronal progresiva en cultivo neuronal (Faas et al., 2010; Ma et al., 2002; Rane et al., 2008; Rane et al., 2004; Wang et al., 2006). Este fenómeno tóxico observado, asociado con el incremento en la dosis de PrP no se restringe a la enfermedad de prion, en otras neuropatías progresivas incluidas enfermedades de alzheimer, de parkinson, son asociados con agregación de proteínas inducidos por sobreexpresión de polipéptidos salvajes (Fuchs et al., 2007; Rovelet-Lecrux et al., 2006; Sleegers et al., 2006). Estas observaciones sugieren que una variedad de factores, incluyendo incrementos en la dosis de la proteína PrP<sup>c</sup>, su acumulación en el citosol, y/o la conversión de PrP<sup>c</sup> a especies neurotóxicas (por ejemplo oPrP<sup>c</sup>), pueden subyacer al mecanismo molecular patogénico.

Aún no hay consenso sobre el mecanismo específico que causa degeneración neuronal en la enfermedad de prion, pero varios mecanismos patológicos han sido postulados incluido mal funcionamiento mitocondrial y activación de apoptosis neuronal (Saá et al., 2016). Se sabe que la activación de vías apoptóticas es un fenómeno muy tardío en la enfermedad de prion (Choi et al., 1998; Forloni et al., 1993; Zhou et al., 2012), y que además representa una explicación general que no provee ningún mecanismo patológico. Chiesa y colaboradores han demostrado que si se elimina la apoptosis neuronal, en un modelo de ratón transgénico para la enfermedad de prion, se previene efectivamente la pérdida neuronal, pero no previene la muerte retrógrada de los axones, la pérdida de conexiones sináptica, ni elimina los síntomas clínicos de la enfermedad (Chiesa et al., 2005). Esta evidencia sugiere que, mientras que la activación de apoptosis puede ser un componente de la enfermedad de prion, alteración en algún otro proceso neuronal sería la de inducir la pérdida de axones y sus sinapsis, así como también la aparición de los síntomas clínicos característicos de estas enfermedades.

Un cuerpo de evidencia experimental sugiere que alteraciones en el transporte axonal rápido podría presentarse como eventos patogénicos tempranos (Arbelaez et al., 2013; Chiesa et al., 2005; Medrano et al., 2008; Uchiyama et al., 2013), tanto como en otros desordenes vinculado a



proteínas mal plegadas (Kanaan et al., 2013; Lazarov et al., 2007; Morfini et al., 2005; Pigino et al., 2003; Roy et al., 2005; Scott & Roy, 2012; Tang et al., 2012). Sánchez –García y colaboradores mostraron que neuronas expresando una forma mutante de PrP-M205, S212 exhiben alteraciones en TA rápido, sinapsis reducida, acumulación axonal de proteínas específicas sinápticas importantes para el crecimiento axonal, fusión vesicular, neurosecreción y neurotransmisión (Bieber et al., 1989; Schulze et al., 1995). Finalmente, Ermolayev y colaboradores mostraron que diferentes cepas de priones presentan una temprana inhibición del TA y una concomitante inducción de síntomas clínicos (Gibbs et al., 2015). Sin embargo, estos estudios no proveen mecanismos por el cual el PrP<sup>c</sup> afecta el TA.

Basados en la evidencia experimental de nuestro colaborador Dr. Ma y su equipo de trabajo los cuales mostraron que la acumulación de prion full length (PrP-FL) dentro del citosol es neurotóxico *in vitro* e *in vivo* (Ma et al., 2002; Wang et al., 2009), así como también de evidencias experimentales de otros grupos que mostraron que la acumulación intracelular de PrP<sup>c</sup> salvaje conduce al mal funcionamiento neuronal y anormalidades sinápticas (Chiesa & Harris, 2001; Fioriti et al., 2005). Decidimos evaluar si la neurotoxicidad de PrP-FL intracelular es debido a la inhibición de TA. Para ello, nuestro grupo colaborador perfundió axoplasmas aislados de calamar con la proteína prion completa PrP-FL en concentraciones fisiológicas posibles (100µM-2 µM), y evaluaron el TA mediante ensayos de motilidad vesicular por videomicroscopía de alta resolución. Estos experimentos demostraron que PrP-FL es un potente inhibidor de TA. Trabajos previos habían mapeado la toxicidad de PrP<sup>c</sup> en el dominio central (CD) (Solomon et al., 2011; Turnbaugh et al., 2011; F. Wang et al., 2010; Westergard et al., 2011). Consistente con éstos estudios nosotros observamos que el péptido sintético de 21 aminoácidos perteneciente al dominio central (Brandenburg et al., 2009) induce una inhibición del TA comparable a la inducida por PrP-FL. Además sugiere que el dominio central (CD) es necesario, ya que cuando se perfunde el constructo de PrP<sup>c</sup> que no posee el dominio central (PrP-ΔCD) el TA no sufre ninguna modificación. Todos éstos experimentos *ex vivo* sugieren que el CD de PrP es necesario y suficiente para inhibir al TA.

Déficits en TA de organelas de membrana son responsables o al menos contribuye significativamente en múltiples neuropatías humanas, en las cuales lo común parece ser la pérdida de axones mostrando una degeneración de muerte retrógrada, como ocurre en la paraplejía espástica hereditaria, enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis

lateral amiotrófica y prion (Chen & Chan, 2009; Crimella et al., 2012; De Vos et al., 2008; Gibbs et al., 2015; Kanaan et al., 2013; Morfini et al., 2013, 2009; Morfini et al., 2005; Pigino et al., 2009; Pigino et al., 2003; Puls et al., 2005; Reid et al., 2002; Vale et al., 1985).

La mitocondria es una organela importante transportada en las células neuronales, ésta genera el ATP necesario para una gran variedad de procesos metabólicos incluyendo TA, crecimiento neuronal, regeneración y supervivencia (Brady, 1991; Nicholls & Budd, 2000). Un gran cuerpo de evidencia experimental documenta que déficits en el transporte de la mitocondria en varias neuropatías humanas se asocia con la actividad de quinasas (Kim-Han et al., 2011; Liu et al., 2012; Pigino et al., 2003). Consistente con estos reportes, nosotros mostramos una reducción significativa de la motilidad mitocondrial en neuronas tratadas con PrP<sub>106-126</sub> versus PrP-Scram. Para ambas el porcentaje de motilidad mitocondrial y el promedio de distancia viajada fue reducido. A pesar de que el mecanismo regulatorio que gobierna el transporte de vesículas de membrana y mitocondrias puede no ser el mismo (Hollenbeck, 2005) el efecto no se restringe solo a la mitocondria, sino que también hay una marcada reducción en las vesículas moviéndose en axoplasmas de calamar tratados con PrP<sup>c</sup>, evidencia de nuestro grupo colaborador.

Interesantemente se observó un perfil diferente de inhibición entre las mitocondrias de células de mamíferos, y las vesículas del axoplasma de calamar. Mientras que PrP<sup>c</sup> afectó ambas direcciones del TA de vesículas, para la mitocondrias el TA anterógrado se inhibió en mayor medida que el TA retrógrado, probablemente debido a las diferencias en el mecanismo regulatorio entre los dos motores que llevan a cabo dichos transportes. Consistente con esta evidencia se sugiere que PrP<sup>c</sup> puede activar a CK2 tanto *in vitro* como *in vivo*, y que la activación de CK2 resulta en la inhibición del TA. De acuerdo con esta evidencia, el inhibidor farmacológico específico de CK2 (DMAT) (Pagano et al., 2004) previno la inhibición del TA inducida por PrP<sup>c</sup> tanto en axoplasma aislado como en un cultivo de neuronas

El desafío que nos quedaba era determinar como PrP<sup>c</sup> y CK2 pueden comprometer el TA. Estudios previos habían indicado que la fosforilación de KLCs por parte de las quinasas GSK3 $\beta$  y CK2, promueven la liberación de la kinesina convencional de las organelas e inhibe el TA de las mismas (Morfini, 2002; Pigino et al., 2009; Pigino et al., 2003). En consecuencia, experimentos bioquímicos en este trabajo revelaron un incremento en la fosforilación de la KLC por parte de CK2, en cultivos de neurona de mamíferos tratadas con PrP<sub>106-126</sub>. La dependencia

con CK2 es demostrada por una reducida inmunoreactividad para 63-90, un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo desfosforilado de KLCs con consenso para CK2.

Consistente con éstos precedentes, el grupo colaborador de EEUU demostró que los niveles de kinesina-1 asociado con organelas fue significativamente reducido en axoplasmas perfundidos con PrP<sub>106-126</sub> con respecto a los perfundidos con PrP-Scram. Resultados similares fueron observados cuando perfundieron con CK2 recombinante y beta amiloide oligomérico ( $\alpha\beta$ ) en axoplasmas aislados de calamar, los cuales inducen la activación de CK2 endógeno (Pigino et al., 2009).

Experimentos en este trabajo respaldan la idea que la proteína completa de prion (PrP-FL) y el dominio central del péptido (PrP<sub>106-126</sub>) inhiben TA a través de un mecanismo molecular que involucra la activación anormal de CK2 endógeno, fosforilación de KLCs, y liberación de los cargos transportados por la kinesina convencional (solo probado en axoplasma de calamar). Además, debemos mencionar que muchas otras proteínas aparte de los motores tienen sitios consensos para CK2 (Meggio & Pinna, 2003), muchas de las cuales pueden contribuir a la degeneración axonal y pérdida sináptica en el contexto de la enfermedad de prion (Olsten & Litchfield, 2004).

Resultados de éste trabajo demuestran que la inhibición farmacológica de CK2 previene la inhibición de TA inducida por PrP<sup>c</sup>. Por lo tanto la inhibición de CK2 puede representar una novedosa intervención terapéutica para prionopatías y otras neuropatías progresivas asociadas con la actividad de CK2 y defectos en TA (Leo et al., 2017; Moreno et al., 2009; Pigino et al., 2009). El desarrollo reciente de inhibidores de CK2 que pueden atravesar la barrera hematoencefálica y acceder al cerebro hacen estos descubrimientos particular y farmacológicamente interesante (Chou et al., 2016; Pagano et al., 2006) como modelo terapéutico. Finalmente, nuestros resultados proveen una base molecular sólida para explorar esta compleja patología en un modelo de ratón PrP<sup>c</sup> transgénico en un futuro cercano.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguzzi, A., Baumann, F., & Bremer, J. (2008). The Prion's Elusive Reason for Being. *Annual Review of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125620>
- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., & Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*. <https://doi.org/10.1038/214764a0>
- Arbelaez, D., Jensen, K., Rincon-Limas, D. E., & Fernandez-Funez, P. (2013). Polar substitutions in helix 3 of the prion protein produce transmembrane isoforms that disturb vesicle trafficking. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt276>
- Baumann, F., Pahnke, J., Radovanovic, I., Rüllicke, T., Bremer, J., Tolnay, M., & Aguzzi, A. (2009). Functionally relevant domains of the prion protein identified in vivo. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006707>
- Baumann, F., Tolnay, M., Brabeck, C., Pahnke, J., Kloz, U., Niemann, H. H., ... Aguzzi, A. (2007). Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601510>
- Bieber, A. J., Snow, P. M., Hortsch, M., Patel, N. H., Jacobs, J. R., Traquina, Z. R., ... Goodman, C. S. (1989). Drosophila neuroglian: A member of the immunoglobulin superfamily with extensive homology to the vertebrate neural adhesion molecule L1. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90029-9)
- Blackstone, C., O'Kane, C. J., & Reid, E. (2011). Hereditary spastic paraplegias: Membrane traffic and the motor pathway. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn2946>
- Blanquet, P. R. (2000). Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous system. *Progress in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00026-X)
- Blasier, K. R., Humsi, M. K., Ha, J., Ross, M. W., Smiley, W. R., Inamdar, N. A., ... Pfister, K. K. (2014). Live cell imaging reveals differential modifications to cytoplasmic dynein properties by phospho- and dephosphomimic mutations of the intermediate chain 2C S84. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.23388>
- Bloom, G. S., Wagner, M. C., Pfister, K. K., & Brady, S. T. (1988). Native Structure and Physical Properties of Bovine Brain Kinesin and Identification of the ATP-Binding Subunit Polypeptide. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi00409a043>
- Brady, S. T. (1985). A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/317073a0>
- Brady, S. T. (1991). Molecular motors in the nervous system. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90365-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90365-7)
- Brady, S. T., & Lasek, R. J. (1982). Axonal Transport: A Cell-Biological Method for Studying Proteins That Associate with the Cytoskeleton. *Methods in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61434-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61434-X)
- Brady, S. T., Lasek, R. J., & Allen, R. D. (1985). Video microscopy of fast axonal transport in

- extruded axoplasm: A new model for study of molecular mechanisms. *Cell Motility*.  
<https://doi.org/10.1002/cm.970050203>
- Brady, S. T., & Morfini, G. A. (2017). Regulation of motor proteins, axonal transport deficits and adult-onset neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease*.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.010>
- Brady, S. T., Pfister, K. K., & Bloom, G. S. (1990). A monoclonal antibody against kinesin inhibits both anterograde and retrograde fast axonal transport in squid axoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.87.3.1061>
- Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W., & Price, D. L. (2012). *Basic Neurochemistry. Basic Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-00066-X>
- Brandenburg, L. O., Lucius, R., Tameh Abolfazl, A., Kipp, M., Wruck, C. J., Koch, T., ... Pufe, T. (2009). Internalization and signal transduction of PrP106-126 in neuronal cells. *Annals of Anatomy*. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2009.06.003>
- Brown, D. R., Herms, J., & Kretzschmar, H. A. (1994). Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic prp fragment. *NeuroReport*.  
<https://doi.org/10.1097/00001756-199410270-00017>
- Brown, D. R., Schmidt, B., & Kretzschmar, H. A. (1996). Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*.  
<https://doi.org/10.1038/380345a0>
- Buckman, J. F., Hernández, H., Kress, G. J., Votyakova, T. V., Pal, S., & Reynolds, I. J. (2001). MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: Influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *Journal of Neuroscience Methods*.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00340-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00340-X)
- Carimalo, J., Cronier, S., Petit, G., Peyrin, J. M., Boukhtouche, F., Arbez, N., ... Miquel, M. C. (2005). Activation of the JNK-c-Jun pathway during the early phase of neuronal apoptosis induced by PrP106-126 and prion infection. *European Journal of Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04080.x>
- Carleton, A., Tremblay, P., Vincent, J. D., & Lledo, P. M. (2001). Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1007/s004240100523>
- Chen, H., & Chan, D. C. (2009). Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics*.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp326>
- Chen, J., Gao, C., Shi, Q., Wang, G., Lei, Y., Shan, B., ... Dong, X. (2008). Casein kinase II interacts with prion protein in vitro and forms complex with native prion protein in vivo. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00486.x>
- Chen, S., Mangé, A., Dong, L., Lehmann, S., & Schachner, M. (2003). Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Molecular and Cellular Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(02\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(02)00014-3)

- Chiesa, R. (2015). The Elusive Role of the Prion Protein and the Mechanism of Toxicity in Prion Disease. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004745>
- Chiesa, R., & Harris, D. A. (2001). Prion diseases: What is the neurotoxic molecule? *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0433>
- Chiesa, R., Piccardo, P., Biasini, E., Ghetti, B., & Harris, D. A. (2008). Aggregated, Wild-Type Prion Protein Causes Neurological Dysfunction and Synaptic Abnormalities. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3109-08.2008>
- Chiesa, R., Piccardo, P., Dossena, S., Nowoslawski, L., Roth, K. A., Ghetti, B., & Harris, D. A. (2005). Bax deletion prevents neuronal loss but not neurological symptoms in a transgenic model of inherited prion disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406173102>
- Chiesa, R., Restelli, E., Comerio, L., Del Gallo, F., & Imeri, L. (2016). Transgenic mice recapitulate the phenotypic heterogeneity of genetic prion diseases without developing prion infectivity: Role of intracellular PrP retention in neurotoxicity. *Prion*. <https://doi.org/10.1080/19336896.2016.1139276>
- Choi, S. Il, Ju, W. K., Choi, E. K., Kim, J., Lea, H. Z., Carp, R. I., ... Kim, Y. S. (1998). Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brains of hamsters infected with the 263 K scrapie agent. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s004010050895>
- Chou, S. T., Patil, R., Galstyan, A., Gangalum, P. R., Cavenee, W. K., Furnari, F. B., ... Ljubimova, J. Y. (2016). Simultaneous blockade of interacting CK2 and EGFR pathways by tumor-targeting nanobioconjugates increases therapeutic efficacy against glioblastoma multiforme. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.001>
- Colby, D., & Prusiner, S. (2011). Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006833>
- Crimella, C., Baschiroto, C., Arnoldi, A., Tonelli, A., Tenderini, E., Airoidi, G., ... Bassi, M. T. (2012). Mutations in the motor and stalk domains of KIF5A in spastic paraplegia type 10 and in axonal Charcot-Marie-Tooth type 2. *Clinical Genetics*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01717.x>
- De Vos, K. J., Grierson, A. J., Ackerley, S., & Miller, C. C. J. (2008). Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090711>
- DeBoer, S. R., You, Y. M., Szodorai, A., Kaminska, A., Pigino, G., Nwabuisi, E., ... Morfini, G. (2008). Conventional kinesin holoenzymes are composed of heavy and light chain homodimers. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi702445j>
- Diack, A. B., Ritchie, D. L., Peden, A. H., Brown, D., Boyle, A., Morabito, L., ... Manson, J. C. (2014). Variably protease-sensitive prionopathy, a unique prion variant with inefficient transmission properties. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2012.140214>
- Ermolayev, V., Cathomen, T., Merk, J., Friedrich, M., Härtig, W., Harms, G. S., ... Flechsig, E.

- (2009). Impaired axonal transport in motor neurons correlates with clinical prion disease. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000558>
- Ermolayev, V., Friedrich, M., Nozadze, R., Cathomen, T., Klein, M. A., Harms, G. S., & Flechsig, E. (2009). Ultramicroscopy reveals axonal transport impairments in cortical motor neurons at prion disease. *Biophysical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.01.032>
- Faas, H., Jackson, W. S., Borkowski, A. W., Wang, X., Ma, J., Lindquist, S., & Jasanoff, A. (2010). Context-dependent perturbation of neural systems in transgenic mice expressing a cytosolic prion protein. *NeuroImage*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.009>
- Fioriti, L., Quaglio, E., Massignan, T., Colombo, L., Stewart, R. S., Salmona, M., ... Chiesa, R. (2005). The neurotoxicity of prion protein (PrP) peptide 106-126 is independent of the expression level of PrP and is not mediated by abnormal PrP species. *Molecular and Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.09.006>
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., & Tagliavini, F. (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/362543a0>
- Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F., & Salmona, M. (1996). Apoptosis-mediated neurotoxicity induced by ??-amyloid and PRP fragments. *Molecular and Chemical Neuropathology*. <https://doi.org/10.1007/BF02815218>
- Forloni, G., Del Bo, R., Angeretti, N., Chiesa, R., Smiroldo, S., Doni, R., ... Tagliavini, F. (1994). A Neurotoxic Prion Protein Fragment Induces Rat Astroglial Proliferation and Hypertrophy. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1994.tb01003.x>
- Fuchs, J., Nilsson, C., Kachergus, J., Munz, M., Larsson, E. M., Schüle, B., ... Farrer, M. J. (2007). Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000254458.17630.c5>
- Gajusek, D. C., Gibbs, C. J., & Alpers, M. (1966). Experimental Transmission of a Kuru-like Syndrome to Chimpanzees. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/209794a0>
- Gibbs, K. L., Greensmith, L., & Schiavo, G. (2015). Regulation of Axonal Transport by Protein Kinases. *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.08.003>
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B., & Cohen, F. E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed  $\alpha$ -helices into trimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402254101>
- Grigoriev, V., Escaig-Haye, F., Streichenberger, N., Kopp, N., Langeveld, J., Brown, P., & Fournier, J. G. (1999). Submicroscopic immunodetection of PrP in the brain of a patient with a new-variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00146-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00146-9)
- Hafezparast, M., Klocke, R., Ruhrberg, C., Marquardt, A., Ahmad-Annur, A., Bowen, S., ... Fisher, E. M. C. (2003). Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1083129>
- Hirokawa, N., & Takemura, R. (2003). Biochemical and molecular characterization of diseases

- linked to motor proteins. *Trends in Biochemical Sciences*.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.08.006>
- Hirokawa, N., & Takemura, R. (2007). Intracellular transport and kinesin superfamily proteins: Structure, function and dynamics. *Lecture Notes in Physics*. [https://doi.org/10.1007/3-540-49522-3\\_5](https://doi.org/10.1007/3-540-49522-3_5)
- Hollenbeck, P. J. (2005). The axonal transport of mitochondria. *Journal of Cell Science*.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.02745>
- Itoh, Y., Yamada, M., Hayakawa, M., Shozawa, T., Tanaka, J. ichi, Matsushita, M., ... Otomo, E. (1994). A variant of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease carrying codon 105 mutation with codon 129 polymorphism of the prion protein gene: A clinicopathological study. *Journal of the Neurological Sciences*. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(94\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0022-510X(94)90138-4)
- Jeffrey, M., Halliday, W. G., Bell, J., Johnston, A. R., Macleod, N. K., Ingham, C., ... Fraser, J. R. (2000). Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathology and Applied Neurobiology*.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2000.00216.x>
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols*.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.356>
- Kanaan, N. M., Pigino, G. F., Brady, S. T., Lazarov, O., Binder, L. I., & Morfini, G. A. (2013). Axonal degeneration in Alzheimer's disease: When signaling abnormalities meet the axonal transport system. *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.003>
- Kanaani, J., Prusiner, S. B., Diacovo, J., Baekkeskov, S., & Legname, G. (2005). Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03469.x>
- Karki, S., Tokito, M. K., & Holzbaur, E. L. F. (1997). Casein kinase II binds to and phosphorylates cytoplasmic dynein. *Journal of Biological Chemistry*.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5887>
- Kim-Han, J. S., Antenor-Dorsey, J. A., & O'Malley, K. L. (2011). The Parkinsonian Mimetic, MPP+, Specifically Impairs Mitochondrial Transport in Dopamine Axons. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0711-11.2011>
- Kitamoto, T., Shin, R. W., Doh-ura, K., Tomokane, N., Miyazono, M., Muramoto, T., & Tateishi, J. (1992). Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol*.
- Lazarov, O., Morfini, G. A., Pigino, G., Gadadhar, A., Chen, X., Robinson, J., ... Sisodia, S. S. (2007). Impairments in Fast Axonal Transport and Motor Neuron Deficits in Transgenic Mice Expressing Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutant Presenilin 1. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4272-06.2007>
- Leo, L., Weissmann, C., Burns, M., Kang, M., Song, Y., Qiang, L., ... Morfini, G. (2017). Mutant spastin proteins promote deficits in axonal transport through an isoform-specific mechanism involving casein kinase 2 activation. *Human Molecular Genetics*.



<https://doi.org/10.1093/hmg/ddx125>

- Levy, J. R., Sumner, C. J., Caviston, J. P., Tokito, M. K., Ranganathan, S., Ligon, L. A., ... Holzbaaur, E. L. F. (2006). A motor neuron disease-associated mutation in p150Gluedperturbs dynactin function and induces protein aggregation. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511068>
- Li, A., Christensen, H. M., Stewart, L. R., Roth, K. A., Chiesa, R., & Harris, D. A. (2007). Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601507>
- Liu, S., Sawada, T., Lee, S., Yu, W., Silverio, G., Alapatt, P., ... Lu, B. (2012). Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002537>
- Lopes, M. H. (2005). Interaction of Cellular Prion and Stress-Inducible Protein 1 Promotes Neuritogenesis and Neuroprotection by Distinct Signaling Pathways. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2313-05.2005>
- Ma, J., Wollmann, R., & Lindquist, S. (2002). Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1073725>
- Mallucci, G. R. (2002). Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.202>
- Matsuda, H., Mitsuda, H., Nakamura, N., Furusawa, S., Mohri, S., & Kitamoto, T. (1999). A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(98\)00135-7](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(98)00135-7)
- Medrano, A. Z., Barmada, S. J., Biasini, E., & Harris, D. A. (2008). GFP-tagged mutant prion protein forms intra-axonal aggregates in transgenic mice. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.03.006>
- Meggio, F., Negro, A., Sarno, S., Ruzzene, M., Bertoli, A., Sorgato, M. C., & Pinna, L. A. (2000). Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2. *Biochem.J*. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3520191>
- Meggio, F., & Pinna, L. A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0473rev>
- Moreno, H., Morfini, G., Buitrago, L., Ujlaki, G., Choi, S., Yu, E., ... Llinás, R. R. (2016). Tau pathology-mediated presynaptic dysfunction. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.044>
- Moreno, H., Yu, E., Pigino, G., Hernandez, A. I., Kim, N., Moreira, J. E., ... Llinas, R. R. (2009). Synaptic transmission block by presynaptic injection of oligomeric amyloid beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900944106>
- Morfini, G. (2002). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and

- negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO Journal*.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.281>
- Morfini, G. A., Bosco, D. A., Brown, H., Gatto, R., Kaminska, A., Song, Y., ... Brady, S. T. (2013). Inhibition of Fast Axonal Transport by Pathogenic SOD1 Involves Activation of p38 MAP Kinase. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065235>
- Morfini, G. A., Burns, M., Binder, L. I., Kanaan, N. M., LaPointe, N., Bosco, D. A., ... Brady, S. T. (2009). Axonal Transport Defects in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3463-09.2009>
- Morfini, G. A., You, Y. M., Pollema, S. L., Kaminska, A., Liu, K., Yoshioka, K., ... Brady, S. T. (2009). Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.2346>
- Morfini, G., Pigino, G., Beffert, U., Busciglio, J., & Brady, S. (2002). Fast axonal transport misregulation and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Medicine*.  
<https://doi.org/10.1385/NMM:2:2:089>
- Morfini, G., Pigino, G., & Brady, S. T. (2005). Polyglutamine expansion diseases: Failing to deliver. *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.12.002>
- Morfini, G., Szebenyi, G., Brown, H., Pant, H. C., Pigino, G., DeBoer, S., ... Brady, S. T. (2004). A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600237>
- Morfini, G., Szebenyi, G., Richards, B., & Brady, S. T. (2001). Regulation of kinesin: Implications for neuronal development. *Developmental Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1159/000048720>
- Nicholls, D. G., & Budd, S. L. (2000). Mitochondria and Neuronal Survival. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.315>
- Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli, C., ... Katamine, S. (1999). A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from Purkinje cell degeneration and demyelination. *Laboratory Investigation*.
- Olsten, M. E. K., & Litchfield, D. W. (2004). Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2. *Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1139/o04-116>
- Pagano, M. A., Cesaro, L., Meggio, F., & Pinna, L. A. (2006). Protein kinase CK2: a newcomer in the "druggable kinome". *Biochemical Society Transactions*.  
<https://doi.org/10.1042/BST0341303>
- Pagano, M. A., Meggio, F., Ruzzene, M., Andrzejewska, M., Kazimierczuk, Z., & Pinna, L. A. (2004). 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: A novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.067>
- Pagano, M. A., Poletto, G., Di Maira, G., Cozza, G., Ruzzene, M., Sarno, S., ... Pinna, L. A. (2007). Tetrabromocinnamic acid (TBCA) and related compounds represent a new class of specific protein kinase CK2 inhibitors. *ChemBioChem*.

<https://doi.org/10.1002/cbic.200600293>

- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., ... Cohen, F. E. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.10962>
- PÉREZ, M., ROJO, A. I., WANDOSELL, F., DÍAZ-NIDO, J., & AVILA, J. (2003). Prion peptide induces neuronal cell death through a pathway involving glycogen synthase kinase 3. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj20021596>
- Pigino, G., Morfini, G., Atagi, Y., Deshpande, A., Yu, C., Jungbauer, L., ... Brady, S. (2009). Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0901229106>
- Pigino, G., Morfini, G., Pelsman, A., Mattson, M. P., Brady, S. T., & Busciglio, J. (2003). Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1001/archderm.1952.01530220096012>
- Pigino, G., Pelsman, a, Mori, H., & Busciglio, J. (2001). Presenilin-1 mutations reduce cytoskeletal association, deregulate neurite growth, and potentiate neuronal dystrophy and tau phosphorylation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. <https://doi.org/21/3/834> [pii]
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*.  
<https://doi.org/10.1126/science.6801762>
- Prusiner, S. B. (1998). Prions, Nobel Lecture. *Pnas*. <https://doi.org/10.1021/bi9721795>
- Puls, I., Oh, S. J., Sumner, C. J., Wallace, K. E., Floeter, M. K., Mann, E. A., ... Ludlow, C. L. (2005). Distal spinal and bulbar muscular atrophy caused by dynactin mutation. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.20468>
- Radovanovic, I. (2005). Truncated Prion Protein and Doppel Are Myelinotoxic in the Absence of Oligodendrocytic PrPC. *Journal of Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0328-05.2005>
- Rane, N. S., Kang, S. W., Chakrabarti, O., Feigenbaum, L., & Hegde, R. S. (2008). Reduced Translocation of Nascent Prion Protein During ER Stress Contributes to Neurodegeneration. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.06.015>
- Rane, N. S., Yonkovich, J. L., & Hegde, R. S. (2004). Protection from cytosolic prion protein toxicity by modulation of protein translocation. *EMBO Journal*.  
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600462>
- Reid, E., Kloos, M., Ashley-Koch, A., Hughes, L., Bevan, S., Svenson, I. K., ... Marchuk, D. A. (2002). A Kinesin Heavy Chain (KIF5A) Mutation in Hereditary Spastic Paraplegia (SPG10). *The American Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1086/344210>
- Roikhel, V. M., Fokina, G. I., Sobolev, S. G., Korolev, M. B., Ravkina, L. I., & Pogodina, V. V.

- (1983). Study of early stages of the pathogenesis of scrapie in experimentally infected mice. *Acta Virologica*.
- Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerrière, A., Vital, A., ... Champion, D. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature Genetics*.  
<https://doi.org/10.1038/ng1718>
- Roy, S., Zhang, B., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2005). Axonal transport defects: A common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathologica*.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-004-0952-x>
- Saá, P., Harris, D. A., & Cervenakova, L. (2016). Mechanisms of prion-induced neurodegeneration. *Expert Reviews in Molecular Medicine*.  
<https://doi.org/10.1017/erm.2016.8>
- Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., & Schachner, M. (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200409127>
- Schäfer, B., Götz, C., & Montenarh, M. (2008). The kinesin I family member KIF5C is a novel substrate for protein kinase CK2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.107>
- Schulze, K. L., Broadie, K., Perin, M. S., & Bellen, H. J. (1995). Genetic and electrophysiological studies of drosophila syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90414-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90414-X)
- Scott, D., & Roy, S. (2012). -Synuclein Inhibits Intersynaptic Vesicle Mobility and Maintains Recycling-Pool Homeostasis. *Journal of Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0535-12.2012>
- Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blättler, T., Brandner, S., Götz, J., ... Weissmann, C. (1998). Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81572-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81572-X)
- Simon, D., Herva, M. E., Benitez, M. J., Garrido, J. J., Rojo, A. I., Cuadrado, A., ... Wandosell, F. (2014). Dysfunction of the PI3K-Akt-GSK-3 pathway is a common feature in cell culture and in vivo models of prion disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*.  
<https://doi.org/10.1111/nan.12066>
- Simoneau, S., Rezaei, H., Salès, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., ... Lasmézas, C. I. (2007). In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030125>
- Slegers, K., Brouwers, N., Gijssels, I., Theuns, J., Goossens, D., Wauters, J., ... Van Broeckhoven, C. (2006). APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awl203>
- Solomon, I. H., Khatri, N., Biasini, E., Massignan, T., Huettner, J. E., & Harris, D. A. (2011). An N-terminal polybasic domain and cell surface localization are required for mutant prion protein toxicity. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.214973>

- Song, Z., Yang, W., Zhou, X., Yang, L., & Zhao, D. (2017). Lithium alleviates neurotoxic prion peptide-induced synaptic damage and neuronal death partially by the upregulation of nuclear target REST and the restoration of Wnt signaling. *Neuropharmacology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.05.021>
- Stenoien, D. L., & Brady, S. T. (1997). Immunochemical analysis of kinesin light chain function. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-52>
- Tang, Y., Scott, D. A., Das, U., Edland, S. D., Radomski, K., Koo, E. H., & Roy, S. (2012). Early and Selective Impairments in Axonal Transport Kinetics of Synaptic Cargoes Induced by Soluble Amyloid  $\beta$ -Protein Oligomers. *Traffic*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01340.x>
- Tateishi, J., & Kitamoto, T. (1995). Inherited Prion Diseases and Transmission to Rodents. *Brain Pathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1995.tb00577.x>
- Turnbaugh, J. A., Westergard, L., Unterberger, U., Biasini, E., & Harris, D. A. (2011). The N-terminal, polybasic region is critical for prion protein neuroprotective activity. *PloS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025675>
- Uchiyama, K., Muramatsu, N., Yano, M., Usui, T., Miyata, H., & Sakaguchi, S. (2013). Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Nature Communications*.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms2873>
- Vale, R. D., Reese, T. S., & Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(85\)80099-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(85)80099-4)
- Waliś, A., Bratosiewicz, J., Sikorska, B., Brown, P., Gajdusek, D. C., & Liberski, P. P. (2003). Ultrastructural changes in the optic nerves of rodents with experimental Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS) or scrapie. *Journal of Comparative Pathology*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(03\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(03)00037-9)
- Walter, J., Schnölzer, M., Pyerin, W., Kinzel, V., & Kübler, D. (1996). Induced release of cell surface protein kinase yields CK1- and CK2-like enzymes in tandem. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.1.111>
- Wang, F., Yin, S., Wang, X., Zha, L., Sy, M.-S. S., & Ma, J. (2010). Role of the highly conserved middle region of prion protein (PrP) in PrP-lipid interaction. *Biochemistry*.  
<https://doi.org/10.1021/bi101146v>
- Wang, X., Bowers, S. L., Wang, F., Pu, X. an, Nelson, R. J., & Ma, J. (2009). Cytoplasmic prion protein induces forebrain neurotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.02.014>
- Wang, X., & Schwarz, T. L. (2009). Chapter 18 Imaging Axonal Transport of Mitochondria. *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)05018-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)05018-6)
- Wang, X., Wang, F., Arterburn, L., Wollmann, R., & Ma, J. (2006). The interaction between cytoplasmic prion protein and the hydrophobic lipid core of membrane correlates with neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512306200>

Westergard, L., Turnbaugh, J. A., & Harris, D. A. (2011). A Nine Amino Acid Domain Is Essential for Mutant Prion Protein Toxicity. *Journal of Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1243-11.2011>

Zamponi, E., Buratti, F., Cataldi, G., Caicedo, H. H., Song, Y., Jungbauer, L. M., ... Pigino, G. F. (2017). Prion protein inhibits fast axonal transport through a mechanism involving casein kinase 2. *PLoS ONE*, 12(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188340>

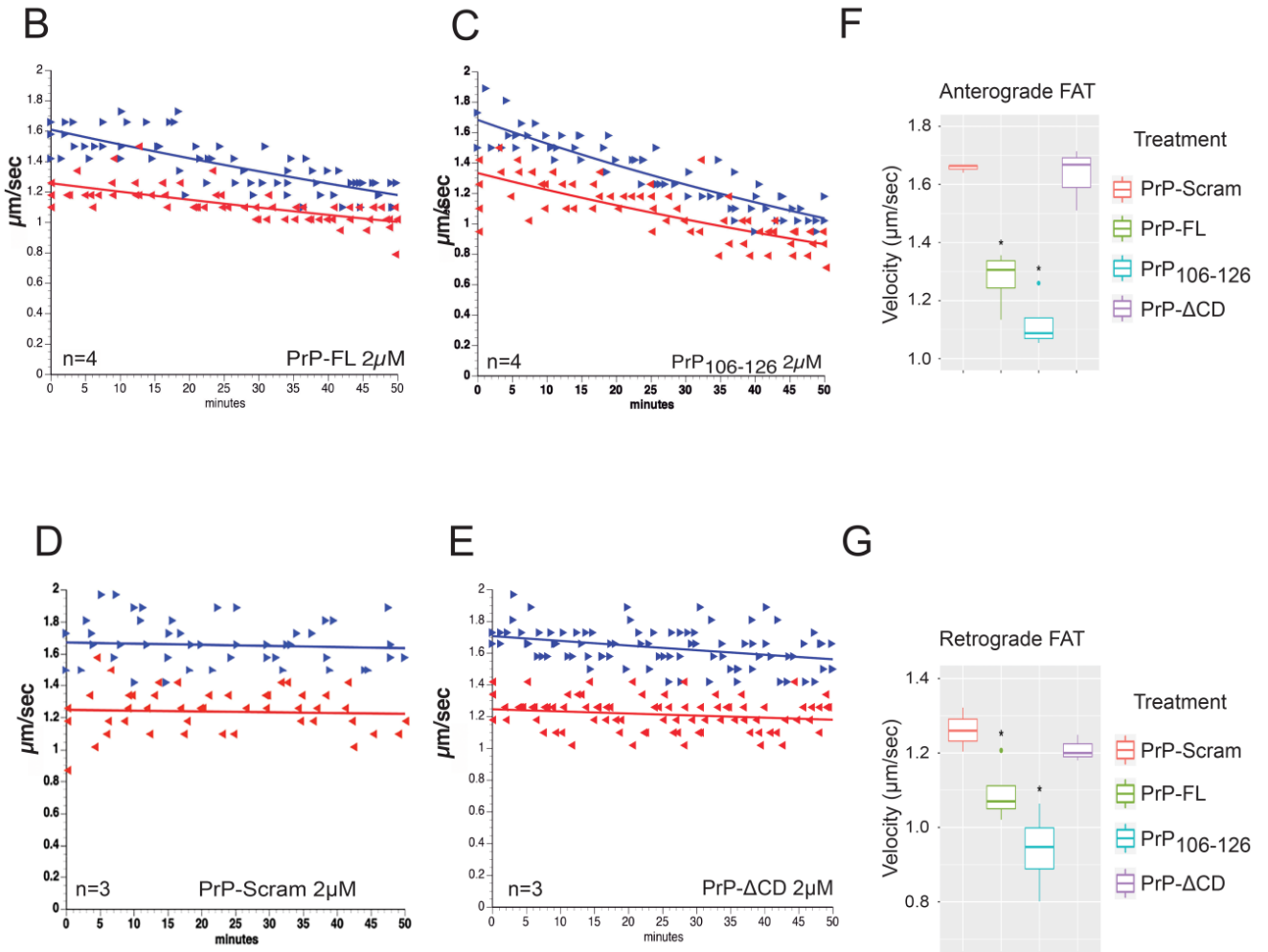
Zhou, M., Ottenberg, G., Sferrazza, G. F., & Lasmezas, C. I. (2012). Highly neurotoxic monomeric  $\alpha$ -helical prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1118090109>

## INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

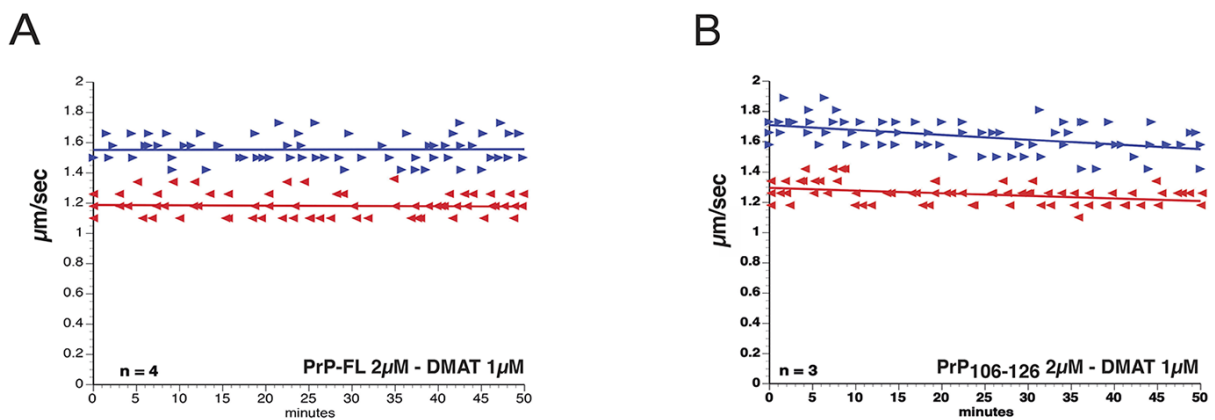
**Figura 8:** Se utilizan sólo estos dos péptidos (PrP<sub>106-126</sub> y PrP-scram) debido a que varios autores, proponen que posiblemente el dominio central (CD, aminoácidos 94-134) puede jugar un rol en la neurotoxicidad de la forma patogénica del PrP (Baumann et al., 2009, 2007; Li et al., 2007).

Li y colaboradores mostraron que los residuos 105-125 del péptido pueden constituir un dominio funcional neurotóxico *in vivo* (Li et al., 2007). Simoneau y otros determinaron que los aminoácidos 105-126 del dominio central hidrofóbico en una conformación oligomérica, presenta neurotoxicidad (Pan et al., 1993) (Simoneau et al., 2007). Extendiendo estos hallazgos, datos experimentales documentaron efectos tóxicos de la proteína prion que abarca los residuos 106-126 en cultivos de neuronas hipocampales, corticales y cerebelares (Brown et al., 1996; Brown et al., 1994; Fioriti et al., 2005; Forloni et al., 1993; Forloni et al., 1996; Forloni et al., 1994). Éstos resultados nos incitó a evaluar si ése dominio central puede mediar el efecto tóxico de PrP-FL en el transporte axonal de diversas organelas de membrana incluyendo a mitocondrias. Además de acuerdo a un análisis por microscopía de fuerza atómica realizado por nuestro grupo colaborador de EEUU liderado por la Dr. Mary Jo LaDu, pudo determinar la presencia de estructuras oligoméricas comunes entre PrP-FL y PrP<sub>106-126</sub>. (Figura suplementaria 3). También probaron todos los péptidos sintéticos de la figura 8, en experimentos de movilidad vesicular en axoplasma de calamar (Figura suplementaria 1)

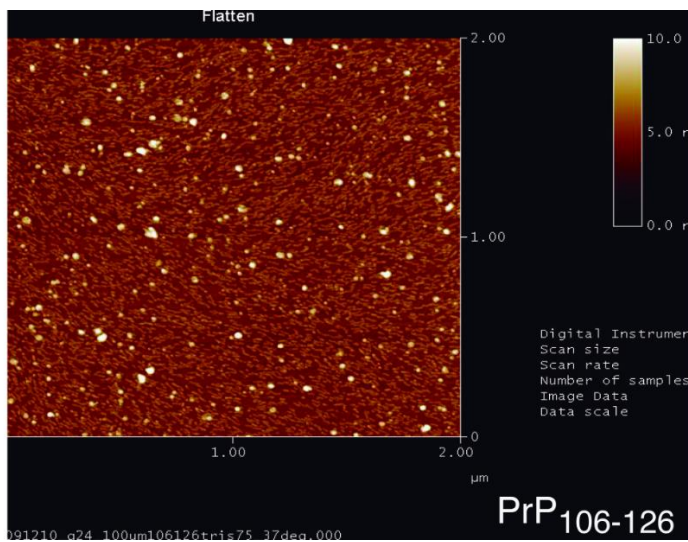
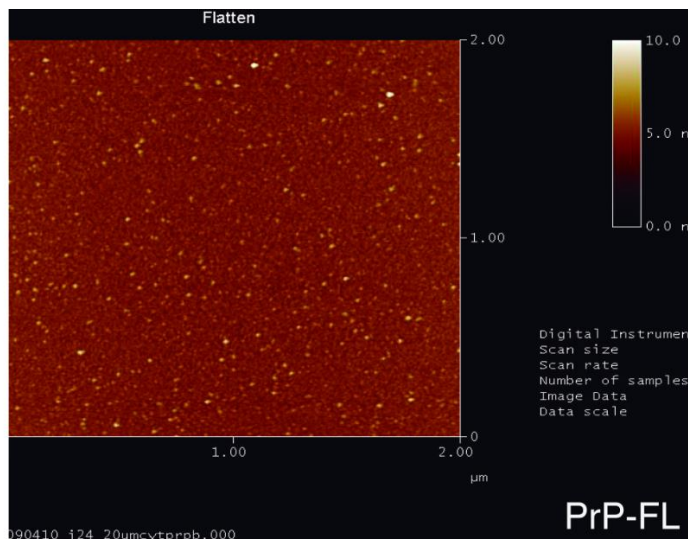
## FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Figura suplementaria 1:** Ensayos de motilidad vesicular en axoplasma de calamar, utilizando diferentes péptidos sintéticos. (Extraído de Zamponi et al., 2017)



**Figura suplementaria 2:** Coperfusión de PrP-FL y PrP<sub>106-126</sub> con el inhibidor de la CK2 (DMAT). (Extraído de Zamponi et al., 2017)



**Figura suplementaria 3:** Imágenes tomadas de microscopía de fuerza atómica de PrP-FL y PrP<sub>106-126</sub> (Extraído de Zamponi et al., 2017)