

Universitat de Lleida

Funció de les quinases MLK2 i KIS en la diferenciació neuronal i en la plasticitat sinàptica

Marta Rafel i Borrell

Dipòsit Legal: L.275-2013

<http://hdl.handle.net/10803/109379>



Funció de les quinases MLK2 i KIS en la diferenciació neuronal i en la plasticitat sinàptica està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

Les publicacions incloses en la tesi no estan subjectes a aquesta llicència i es mantenen sota les condicions originals.

(c) 2012, Marta Rafel i Borrell



Universitat de Lleida
Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques



Institut de Recerca
Biomèdica de Lleida

Funció de les quinases MLK2 i KIS en la diferenciació neuronal i en la plasticitat sinàptica

Marta Rafel i Borrell

Directora de Tesi

**Dra. Carme Gallego
González**

Directora de Tesi

**Dra. Neus Pedraza
Gonzalez**

Tutor de Tesi

Dr. Eloi Garí Marsol

Memòria presentada per Marta Rafel i Borrell per a optar al títol de Doctor per la Universitat de Lleida.

Treball dirigit per la Dra. Carme Gallego González i la Dra. Neus Pedraza Gonzalez, de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona i tutorada pel Dr. Eloi Garí Marsol del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida.

Lleida, 19 de Maig del 2012

*...No deixis mai de somniar,
perquè somniar és el principi d'un somni fet realitat...*

Al Sergi...

Al Ludo...

Al Josep, la Montse i l'Aniol...

RESUM

Agraïments

CAPÍTOL I. La quinasa MLK2 en la regulació de la via de supervivència neuronal del TrkB a través del factor de transcripció E47

INTRODUCCIÓ

1. El TrkB en les vies de supervivència neuronal	5
2. Factors de transcripció HLH.....	12
3. Estructura i Activitat de l'E47	16
4. Mixed Lineage Kinases.....	20
5. Efecte de les MLKS en càncer i en malalties neurodegeneratives.....	29
6. OBJECTIUS	35

RESULTATS

7. Identificació de proteïnes que interaccionen amb l'E47	39
8. La MLK2 interacciona amb l'E47	41
9. L'E47 és fosforilat en presència de la MLK2 <i>in vivo</i>	44
10. L'E47 és fosforilada en presència de la MLK2 al domini d'activació AD2	46
11. La MLK2 fosforila a l'E47 <i>in vitro</i>	52
12. La MLK2 inhibeix l'activitat transcripcional de l'E47 sobre el promotor del TrkB	54
13. La repressió transcripcional sobre el promotor del TrkB per la MLK2 necessita els residus S/T identificats al motiu LH de l'E47.	56

DISCUSSIÓ

14. La MLK2 fosforila l'E47 inhibint la seva activitat transcripcional ..	61
15. La fosforilació de l'E47 per la MLK2 pot ser determinant pel destí cel·lular de neurones granulars del cerebel.	65

16.	Efectes fisiològics en l'alteració de la via de supervivència TrkB/PI3K/AKT	66
-----	--	----

CAPÍTOL II. Implicació de la quinasa KIS en traducció neuronal localitzada

INTRODUCCIÓ

17.	Traducció localitzada en neurones i plasticitat sinàptica	73
18.	Regulació general de la traducció en eucariotes	74
19.	Control de la traducció a la sinapsi	76
20.	Composició dels grànuls de transport d'RNA	80
21.	Repressió de la traducció durant el transport d'mRNA.....	84
21.1.	eIF4E-binding proteins (4E-BP).....	85
21.2.	Proteïnes que actuen com una 4E-BP (4E-BP like proteins):	85
21.2.1.	CPEB (Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein)	85
21.2.2.	Fragil X Mental Retardation Protein (FMRP)	87
21.2.3.	FMRP-CYFIP-BC1	89
21.3.	Altres proteïnes inhibidores de la traducció d'mRNAs	90
21.3.1.	ZBP1	90
21.3.2.	eIF4AIII.....	91
21.3.3.	eEF2.....	91
22.	Desrepressió de l'mRNA localitzat.....	92
23.	KIS	93
24.	ANTECEDENTS.....	96
24.1.	La quinasa KIS en grànuls d'RNA i en traducció localitzada a les neurites	96
25.	Borealina	99
26.	NUFIP1	100
27.	OBJECTIUS	103

RESULTATS

28. La KIS co-immunoprecipita amb la KIF3A i mRNAs transportats en partícules RNP en extrems de cervell. 107

29. L'mRNA de β -actina colocalitza amb la KIS 110

30. La KIS interacciona amb proteïnes importants per la traducció localitzada 112

31. La NUFIP1 i la Borealina es troben en fraccions enriquides en grànuls d'RNA 118

32. Proteïnes substrats de la quinasa KIS..... 121

33. La KIS i la NUFIP1 són importants per mantenir els nivells d'mRNAs transportats en grànuls 122

34. Anàlisi de l'autofosforilació de la KIS 124

35. Regulació de la KIS: Anàlisi de la fosforilació de la KIS per la quinasa Src 128

DISCUSSIÓ 133

36. La Borealina i la NUFIP1, nous components de grànuls de transport d'mRNA que interaccionen amb la KIS. 136

37. La KIS co-localitza amb mRNAs implicats en plasticitat sinàptica 138

38. La KIS i la NUFIP1 són importants per l'expressió d'alguns mRNAs transportats al grànul..... 139

39. El residu T320 de la quinasa KIS és important per la seva autofosforilació i per la fosforilació dels seus substrats 140

40. Efecte de les fosforilacions de la Src a les proteïnes del grànul on es troba la KIS 141

41. Col·laboren la KIS i la Src a la traducció d'mRNAs sinàptics? 143

CONCLUSIONS 149

MATERIALS I MÈTODES 151

44. Cultius cel·lulars 153

ÍNDEX

45.	Construccions plasmídiques	157
46.	Transfeccions i tractaments cel·lulars	162
47.	Obtenció de Lentivirus en cèl·lules HEK-293T i infecció	163
48.	Producció d'un anticòs policlonal contra la KIS	164
49.	Purificació per Afinitat en Tàndem (TAP)	165
50.	Immunoprecipitació (IP)	167
51.	Purificació de grànuls d'mRNA.....	168
52.	Western blot.....	169
53.	Assaigs Luciferasa	171
54.	Producció i purificació de proteïna recombinant.....	171
55.	Assaig Quinasa in vitro	175
56.	Immunofluorescència	175
57.	Detecció de l'mRNA de β -actina per Hibridació Fluorescent in-situ (FISH).	176
58.	PCR quantitativa	177
	BIBLIOGRAFIA	179
	ÍNDEX De TAULES i FIGURES	207
	ANNEX	211

RESUM

La diferenciació dels precursors neuronals en cèl·lules especialitzades implica una restricció de la seva capacitat proliferativa i la sortida definitiva del cicle cel·lular. Entre les proteïnes HLH activadores de la diferenciació hi ha les proteïnes E (E47, E12, HEB, E2-2), les quals s'expressen a la majoria de teixits. Al nostre laboratori es va descriure que la proteïna E47 forma heterodímers amb la proteïna HLH específica de teixit NeuroD, i activa l'expressió del receptor del BDNF (TrkB) i l'inhibidor de cicle p21^{CIP} en resposta a la senyal diferenciadora d'àcid retinoic (RA). La correcta expressió del receptor TrkB juga un paper clau en el desenvolupament del sistema nerviós en vertebrats i la seva alteració s'ha relacionat amb diferents malalties humanes importants. En aquest treball s'ha demostrat que la quinasa MLK2 interacciona amb la bHLH E47 en cèl·lules de neuroblastoma SHSY-5Y. Es proposa que la MLK2 controla l'activitat del factor bHLH E47 a través de la seva fosforilació, la qual redueix l'activació del promotor de trkB. A més, la inhibició de la MLK2 augmenta l'expressió de l'mRNA de trkB *in vivo* explicant perquè aquesta inhibició no només prevé l'activació dels processos de mort cel·lular sinó que també ajuda a les vies de supervivència.

D'altra banda, estudis molt recents revelen la importància dels processos de localització d'mRNAs als axons i a les dendrites i la seva traducció localitzada. Conèixer com es regula la localització dels mRNAs i la seva traducció localitzada a nivell molecular ajuda a entendre aspectes fonamentals de la plasticitat i la diferenciació neuronal. Durant el transport dels mRNAs, la seva traducció està reprimida i aquesta s'activa a llocs concrets com a resposta a senyals sinàptics, i en conseqüència, s'activa la plasticitat neuronal. Prèviament, al nostre laboratori, es va demostrar que la proteïna KIS pot estimular la traducció localitzada d'mRNAs, afavorir el creixement neurític i la supervivència neuronal. En aquest treball demostrem que la KIS interacciona amb proteïnes i mRNAs implicats en activitat sinàptica, els quals són transportats a través de partícules mRNP. La nostra hipòtesi és que quan el grànul transportat per KIF3A arriba al seu destí, diversos estímuls sinàptics possiblement indueixin l'activació de la quinasa Src, la qual fosforila la KIS, activant la traducció dels mRNAs transportats.

RESUMEN

La diferenciación de precursores neuronales en células especializadas implica la restricción de su capacidad proliferativa y la salida definitiva del ciclo celular. Entre las proteínas HLH activadoras de la diferenciación están las proteínas E (E47, E12, HEB, E2-2) las cuales se expresan en la mayoría de los tejidos. En nuestro laboratorio se describió que la proteína E47 forma heterodímeros con la proteína HLH específica de tejido, NeuroD, y activa la expresión del receptor de BDNF (TrkB) y el inhibidor de ciclo p21^{CIP} en respuesta a la señal diferenciadora del ácido retinoico (RA). La correcta expresión del receptor TrkB juega un papel clave en el desarrollo del sistema nervioso en vertebrados y su alteración se ha relacionado con diferentes enfermedades humanas importantes. En este trabajo se ha demostrado que la quinasa MLK2 interacciona con la bHLH E47 en células de neuroblastoma SHSY-5Y. Se propone que MLK2 controla la actividad del factor bHLH E47 a través de su fosforilación, la cual reduce la activación del promotor de trkB. Además la inhibición de MLK2 aumenta la expresión del mRNA de trkB *in vivo* explicando por qué esta inhibición no sólo previene la activación de los procesos de muerte celular sino que también ayuda a las vías de supervivencia.

Por otro lado, estudios muy recientes revelan la importancia de los procesos de localización de mRNAs en axones y dendritas y de su traducción localizada. Conocer cómo se regula la localización de los mRNAs y su traducción localizada a nivel molecular ayuda a entender aspectos fundamentales de la plasticidad y la diferenciación neuronal. Durante el transporte de los mRNAs su traducción está reprimida y ésta se activa en lugares concretos en respuesta a señales sinápticas resultando en la activación de la plasticidad neuronal. Previamente, en nuestro laboratorio, se demostró que la proteína KIS puede estimular la traducción localizada de mRNAs, favorecer el crecimiento neurítico y la supervivencia neuronal. En este trabajo demostramos que KIS interacciona con proteínas y mRNAs implicados en actividad sináptica, los cuales son transportados a través de partículas mRNPs. Nuestra hipótesis es que cuando el gránulo transportado por KIF3A llega a su destino, varios estímulos sinápticos posiblemente induzcan la activación de la quinasa Src la cual fosforila KIS, activando la traducción de los mRNAs transportados.

ABSTRACT

The differentiation of neuronal precursors in specialized cells induces an increase of a restriction of their proliferative capacity and a complete exit of the cell cycle. Among the HLH protein activators of differentiation the E protein family (E47, E12, HEB, E2-2) is expressed in most of the tissues. In our laboratory it has been described that in response to the differentiating signal of retinoic acid (RA), E47 heterodimerizes with the HLH protein tissue specific NeuroD which activates the expression of the receptor BDNF (TrkB) and the cell cycle p21^{CIP} inhibitor. TrkB expression plays a key role in the nervous system development in vertebrates, and its alteration has been related with different types of important human diseases. In the present work we identified the kinase MLK2 as an E47-interaction protein in SHSY-5Y human neuroblastoma cells. We propose MLK2 as a controller of the BDNF receptor TrkB through the phosphorylation of bHLH transcription factor E47 which reduces the activation of trkB promoter. Furthermore, MLK2 inhibition increases trkB mRNA expression *in vivo*. These results could explain the reason why the inhibition of MLKs avoid the activation of cell death program and also increase the cell survival pathway being a key component of their neuroprotector potential.

In the other hand, recent studies some recent work reveal the importance of mRNA localization in axons and dendrites and its local translation. Unraveling how mRNA localization and its translation are regulated at molecular level will help to understand basic processes of neuronal differentiation and plasticity. Translation is inhibited during mRNA transport, and is activated in specific synapses in response to synapse signals resulting from activation of neuronal plasticity. Previous work from our laboratory demonstrated that protein kinase KIS can stimulate the local translation of mRNAs, increase the neuritic outgrowth and the neural survival. In the present work we demonstrate that KIS can interact with transported granular proteins and mRNAs important for the synaptic activity. Our hypothesis is that when the granule reaches his fate through KIF3A, some synaptic stimuli induce the activation of the kinase Src, which phosphorylates KIS, therefore activating the transported transcript.

Cada experiència de la vida és absolutament necessària per poder arribar al punt següent, i al següent lloc, fins aquest mateix moment.

Wayne W. Dyer

Agraïments

Primer de tot vull agrair a les meves directores de Tesi, Carme Gallego i Neus Pedraza per guiar-me en aquest treball i ensenyar-me tot el necessari per estar al món de la recerca bàsica. Carme, gràcies per haver confiat en mí en uns inicis per mí molt durs. Neus, què hauria fet sense tu? Gràcies per saber escoltar, i ajudar-me sempre.

També mil gràcies a la resta del laboratori del CYC: Martí Aldea, ha sigut un plaer haver pogut aprendre al teu costat. A l'Eloi Gari, on només puc resumir tot el meu agraïment en una paraula GRÀCIES. Tant durant els anys que ha durat la Tesi com en aquest últim any, gràcies per respondre als meus dubtes i ajudar-me quan ho he necessitat, crec que ets una de les millors persones que he conegut, tant en valors com en coherència. Al Jordi, per ensenyar-me que si es vol, un pot arribar allà on es proposi, sense deixar ni la feina ni la família de banda. A la Neus Colomina, per ser com ets; tant humana i tant sincera. Per no riure't de ningú valorant tots i cadascun dels dubtes que se't proposen, la humilitat i el respecte són unes grans virtuts. Al Paco, per compartir tus experiències. És divertit oír tus històries; nunca oblidaré la cançó de la PCR. Sera! Només de pensar amb tu ja somric. Portes una màgia allà on vas que crees bon rotllo per naturalesa, gràcies per ensenyar-me a riure de mí mateixa i dels altres, i per ser el meu 'maître', ensenyar-me tantes coses del lab i de les ratetes, pobretes! Em vas ensenyar a

AGRAÏMENTS

treure ferro a l'assumpte i a fer-ho més amè. Gràcies pels teus comentaris i ajut, per estar sempre a prop, ets un referent per mi. A la Isis, amb el somriure sempre a punt, i llàgrimes als ulls de tant riure. Gràcies per ensenyar-me a treballar a cultius amb el teu ordre i cura. Ens queda pendent un Southern eh!. A la Rita, empezamos juntas, qué recuerdos! Y este camino ya se acaba... para tí ya se acabó y empezaste otro, y yo a puntito estoy. Gracias por tu amistad, por escucharme cuando tanto lo he necesitado, hacerme racionalizar la situación y buscar soluciones. A la María, la nostra little, que de little no en té res, crec que amb el teu anar fent, vas aconseguint les coses que et proposes amb seny i que tens les coses clares. Gràcies per passar-me un pèl d'aquesta saviesa que tens, i guiar-me, sobretot en els últims temps. Ha estat divertit compartir l'experiència de ser mames i fer ciència alhora. Gràcies per ser com ets i per la teva amistat. A la Sònia, què et puc dir que no sàpigués? Ets una gran persona i una gran amiga, mil gràcies per estar i per haver pogut compartir amb tu tot aquest temps. Al Marcello, moltes gràcies per la teva amistat i per estar sempre disposat a escoltar-me, sé que hi ha edició limitada. Espero que encara que siguis lluny ens seguim veient, mil mercès per les xerrades, pels videos yutuberos i per tot el viscut! A la Siba! Gracias por tu amistad y por estar ahí. Sigue así, no olvides tus sueños y siempre lucha por lo que quieres! Nos queda pendiente una esquíada. To Galal, I'm glad to see your evolution this years here. Now you are married and soon father!!! I'm so happy for you! Don't ever change, your way to be it make you a very true gentelman. A la Irene, la primera de la segona generació del CYC, gràcies per ser-hi, en tots els sentits. M'encanta poder estar al teu costat, taula amb taula i seguint fent el que t'agrada. Tot és compatible oi! Ara ja ets mama i la teva vida ha fet un gir, però també ha fet que hagi descobert una bona amiga amb la que puc comptar. Siempre Positiva!. Noel! La última incorporació. Moltes

gràcies per ser com ets. El teu tarannà fa que hi hagi una bona dosi de bon rotllo i bones intencions al laboratori. Gràcies per fer-me reviure la innocència i il·lusió del principi de la Tesi. No canviïs, t'espera un llarg camí, i espero poder-lo disfrutar al teu costat. A la Inma i a l'Alba, mil gràcies per haver-me ajudat a cultius, no sé com hauria pogut fer tantes disseccions i cuidar tants cultius sense vosaltres, mil gràcies. A la Èlia, tot i que no ets del CYC, hi tens un racó especial reservat. És genial parlar amb tu, tant de ciència com de coses personals. No canviïs mai. Gràcies també al Jacint Boix per la seva amabilitat i deixar-me el despatxet per escriure durant els primers mesos. Gràcies a la Xènia, per les bones estones passades i per compartir pors i il·lusions. A l'Alba per les estones compartides i per fer de cangur. El Sergi encara relaciona casa vostra i jugar a Hockey. Manu, no me olvido de tí, gracias por tus reflexiones i estratègies para seguir adelante. Me encanta ver como creces! També voldria donar tot el meu agraïment a la resta dels departaments CMB i MEX per haver-me ajudat quan ho he necessitat.

No podria acabar aquests agraïments sense pensar en qui ha fet possible des de el principi que arribés fins aquí. Si penso en el primer cop que vaig trepitjar un laboratori jo encara duia bolquers. La ciència m'ha rodejat sempre, acompanyant-te a tu mama al laboratori, i mirant quin material ens podia servir de joguina: Unes boles dins un tub de plàstic, una caixa d'enzims per guardar els colors... Veure 't a tu papa fent la Tesi amb un portàtil als estius i passar algunes tardes a la facultat de química mentre tu parlaves amb els teus..., explicant-me teoremes de física que no entendria bé del tot fins a primer de carrera... Per això només us puc donar mil milions de gràcies per haver-me educat així. Gràcies per haver estat al meu costat, per intentar apaivagar la meva curiositat responent-me les mil preguntes amb les que us turmentava inclús fins al punt

AGRAÏMENTS

d'arribar a barallar-nos per coses sense importància. Segurament això va fer créixer la meva curiositat per saber com funcionava tot i ja només per això us estic eternament agraïda. Mama, gràcies també per estar sempre al meu costat! I quan després d'haver cursat els 3 primers anys d'agrònoms em vaig adonar que m'encantava la genètica i la biologia molecular i no en tenia prou coneixements, em vas donar tot el suport per poder seguir aquest camí. Gràcies per ajudar-me en tot i més, tant com a mare, com a àvia i com a científica. Papa, gràcies per no perdre mai la confiança en mi i creure que jo podia arribar on em dictes el cor. Tot i que a vegades no recordaves si encara treballava amb plantes o amb ratolins. Gràcies per les xerrades que hem tingut i per escoltar-me encara que estiguessis cansat. Gràcies per cuidar del Sergi venint de tant lluny, no tothom estaria disposat a fer-ho, ho valoro molt. Gràcies també al meu xermanet Aniol, per prendre't la feina sempre seriosament i per ser qui ets i com ets, pensa que el teu tarannà guia el meu camí. Estic molt orgullosa de tu. A la Duna, gràcies, gràcies, gràcies, gràcies, etc. Ja saps que per mi ets com una germana. I gràcies també a totes les del grup, Marta S, Ingrid, Araceli, Xènia, Miquel, Stefan, Santi, no em puc imaginar la meva vida sense compartir-la amb vosaltres. I sobretot encara que ja no em pots sentir, mil gràcies Eli, per haver estat sempre amb nosaltres, per estar pendent de les nostres preocupacions molt més banals que les teves. Gràcies per ensenyar-me a valorar les coses importants de la vida i fer-me adonar que la resta són supèrflues, com diu el teu pare, has estat un àngel que ha vingut a ensenyar-nos a viure i a estimar-nos.

Gràcies també als d'agrònoms, tant les de Barcelona com els de Lleida, Pati, Olga, Georgina, vau 'patir' amb mi la il·lusió del principi d'aquest projecte, gràcies per entendre'm i donar-me suport fins al final. A la Meritxell, per tot el viscut i la complicitat que

tenim. A la Natí, la Júlia, la Judit i el German. Gràcies per estar aquí, és genial viure a Lleida si també hi sou vosaltres.

Volia agrair als meus sogres per haver-me entès i donat suport en aquest procés. Ludo, mil gràcies. Per ensenyar-me des de zero a treballar en un laboratori, a ser el meu professor particular i per ajudar-me a continuar estimant la ciència malgrat totes les dificultats que això comporta. Gràcies per ser el meu pensament en veu alta, per ser el millor pare del món i per poder compartir junts el millor que ens ha donat el nostre amor: el nostre Sergi (i el/la que vindrà). Gràcies per entendre'm tal com sóc i per tot el teu suport en tots els sentits de la paraula. Sé que sense tu, segurament, hauria llençat la tovallola.

I finalment, a tu tresor de la meva vida, tot i que ara encara ets petit, sàpigues que has estat el millor que m'ha passat mai, i que contràriament al que es pugui pensar, haver-te tingut durant la Tesi, no m'ha fet perdre la motivació en cap moment sinó que me n'ha donat més. T'agraeixo la teva paciència i el teu amor, que és el millor antídot per qualsevol mal. Sempre recordaré que per tu, anar a treballar, vol dir anar a fer la Tesi.

La quinasa MLK2 en la regulació de la via de supervivència neuronal del TrkB a través del factor de transcripció E47.

CAPÍTOL I

INTRODUCCIÓ

1. El TrkB en les vies de supervivència neuronal

El TrkB (*Tropomyosin-related kinase B*) és el receptor del BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), una neurotrofina molt conservada en vertebrats que té un paper important durant el desenvolupament del cervell i en la plasticitat sinàptica (Cohen-Cory *et al.* 2010).

A més del TrkB existeixen altres receptors neurotròfics tirosina-quinasa com el TrkA i el TrkC. Els receptors TrkA, TrkB i TrkC s'expressen àmpliament tant en el sistema nerviós perifèric com en el sistema nerviós central de manera no superposada. El BDNF, el NGF (*Nerve Growth Factor*), el NT-3 i el NT-4 (Neurotrofina-3 i 4 respectivament) són neurotrofines que s'uneixen a receptors transmembrana de la família de receptors tirosina quinasa Trk i de la família de receptors neurotròfics p75 (p75NTR), els quals pertanyen a la superfamília de receptors de factors de necrosi tumoral. El NGF s'uneix al TrkA de forma específica, mentre que el BDNF i el NT-4 s'uneixen al TrkB i el NT-3 s'uneix al TrkC, tot i que també es pot unir al TrkA i al TrkB (Huang *et al.* 1999). Les neurotrofines són unes proteïnes que pertanyen a la família dels factors de creixement del sistema nerviós, les quals ajuden a la supervivència neuronal i a la diferenciació jugant un paper clau en el desenvolupament del sistema nerviós. D'aquesta manera, les neurotrofines i els seus receptors Trk regulen la supervivència i la diferenciació tant de les neurones perifèriques com de les centrals (Lei, Parada 2007).

Les neurotrofines, que se sintetitzen intracel·lularment com a precursors proteïcs (pro-neurotrofines), seran secretades de forma madura i biològicament actives. Aquestes afecten el desenvolupament i la maduració dels circuits neuronals, alliberant-se a mesura que aquest desenvolupament va tenint lloc (Lei, Parada 2007, Minichiello 2009). El receptor P75 té poca afinitat per les neurotrofines madures, en canvi les pro-neurotrofines poden actuar com a pro-apotòtics a través del p75, induint la PTEN (Cohen-Cory *et al.* 2010). Aquesta proteïna la qual desfà l'activació la via de la PI3-K indueix l'apoptosi (Lee *et al.* 2001, Song *et al.* 2010, Teng *et al.* 2005). Les

CAPÍTOL I - INTRODUCCIÓ

neurotrofines madures formen dímers estables i s'expressen a nivells molt baixos durant el desenvolupament (Chao 2003).

A part de produir els efectes clàssics en supervivència neuronal (Huang *et al.* 1999);(Brodeur *et al.* 1997, Brodeur *et al.* 1997)(Minichiello 2009), les neurotrofines també poden regular el creixement i la guia axonal i dendrítica, les connexions sinàptiques i la seva estructura, l'alliberament de neurotransmitors, la potenciació a llarg termini (LTP, (*Long-Term potentiation*)) i la plasticitat sinàptica.

Els nivells de neurotrofines són bàsics per determinar l'equilibri entre supervivència cel·lular o l'apoptosi, durant el desenvolupament. L'alteració de l'expressió dels receptors Trk ha estat associada a diverses malalties humanes relacionades amb el desenvolupament neurobiològic, a malalties neurodegeneratives i a desordres psiquiàtrics; així, per exemple, nivells baixos de NGF produeixen deficiència en l'adquisició i retenció de memòria. En absència de nivells normals de BDNF, els ratolins mostren més depressió i elevació de l'agressivitat, de la hiperactivitat i de la hiperfàgia. A més, en humans s'ha demostrat que un polimorfisme en el pro-Domini del BDNF està relacionat amb depressió, desordres bipolars i esquizofrènia (Chao 2003).

En el sistema nerviós central, el TrkA s'expressa en neurones colinèrgiques del prosencèfal basal. Aquestes neurones són les majors proveïdores de molècules colinèrgiques al còrtex cerebral i a l'hipocamp, i estan greument afectades en malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer o en malalties com la Síndrome de Down. (Lei, Parada 2007). A més, en condicions patològiques, els receptors Trk s'utilitzen com a marcador del pronòstic dels tumors neuroblastoma. En aquests tumors, quan el TrkA es troba sobreexpressat es consideren de bon pronòstic, ja que es creu que el TrkA podria promoure l'aturada de cicle i la diferenciació d'aquestes cèl·lules tumorals. En canvi el TrkB està associat amb tumors malignes de neuroblastoma, mentre que el TrkC, en canvi, es relaciona amb tumors favorables (Lei, Parada 2007). Recentment s'ha demostrat que en tumors de neuroblastoma en els que mancaven neurotrofines, el TrkA i el TrkC conduïen a la mort apoptòtica, mentre que no passava el mateix amb el TrkB, amb el que s'observa una major supervivència (Nikoletopoulou *et al.* 2010, Bouzas-Rodriguez *et al.* 2010).

S'ha suggerit que la supervivència de neurones de tipus específic i les seves dianes estan sota el control de neurotrofines concretes i els seus receptors. Per exemple, als mutants de ratolí els quals els falta el BDNF i el TrkB perden la majoria de les neurones vestibulars. A més a més els ratolins als que els manca l'expressió del receptor TrkB mostren absència d'innervació de *hair cells* en una regió específica de la part apical de la còclea de l'oïda durant el desenvolupament, la qual és responsable de la pèrdua d'audició en molts models animals. Aquesta pèrdua d'audició és capaç de revertir-se amb l'estimulació d'aquestes neurones a través de les neurotrofines pertinents (Schimmang *et al.* 2003).

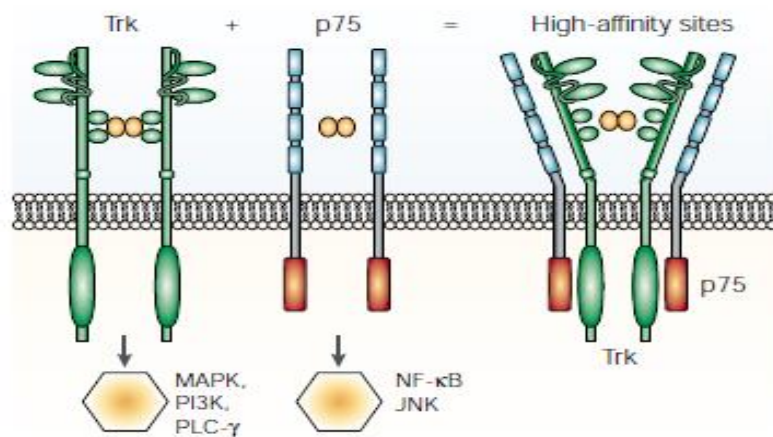


Figura 1 Model de l'activació dels receptors Trk i p75. Els receptors dimeritzen per facilitar la unió de les neurotrofines. Cada neurotrofina s'uneix de manera específica a un receptor Trk, però totes les neurotrofines s'uneixen a p75. La interacció entre els receptors Trk i p75 augmenta l'afinitat vers les respectives neurotrofines. Cada receptor activa diferents vies, tal com indica la figura (Chao 2003).

1.1. Activació dels receptors Trk

L'afinitat de la unió del BDNF al seu receptor TrkB i del NGF al TrkA augmenta quan els receptors homodimeritzen o s'associen amb p75, el qual pot associar-se amb cada una de les neurotrofines permeten a p75 participar en l'estimulació de processos de creixement (**Figura 1**). La dimerització del receptor Trk permet l'autofosforilació dels residus tirosina presents al seu domini quinasa, a la part intracel·lular de la proteïna; en conseqüència, quan aquestes tirosines estan fosforilades actuen de *docking site* per a les

CAPÍTOL I - INTRODUCCIÓ

molècules adaptadores Shc (*Src homologous and collagen-like*) i s'activen les cascades de senyalització intracel·lulars (Chao 2003).

Les Shc uneixen el receptor Trk activat a dues vies de senyalització independents: la de supervivència neuronal PI3K-Akt i la de diferenciació i supervivència ERK augmentant l'activitat de Ras.

A més, la unió de la fosfolipasa C γ (PLC- γ) als receptors Trk activats inicia una cascada de senyalització intracel·lular que resulta en l'activació de la proteïna quinasa C (PKC), la qual és crucial per induir l'E-LTP (*early-long term potentiation*); a més de facilitar l'activació del factor de transcripció CREB, el qual té efectes al cycle cel·lular, el creixement neurític i la plasticitat sinàptica (Chao 2003)(Minichiello 2009).

D'altra banda, a través de la unió d'uns altres adaptadors al domini citoplasmàtic del receptor p75 com el NRIF (*neurotrophin-receptor interacting factor*), el NADE (*neurotrophin associated cell death executor*), el NRAGE (*neurotrophin-receptor interacting MAGE homologue*), el SC1 (*Schwann cell 1*) o el RIP2 (*Receptor-interacting protein 2*), les neurotrofines activen el receptor p75, propiciant l'activació de vies de mort cel·lular, com les vies de JNK, o d'inflamació cel·lular com el NF- κ B o les ceramides que pot acabar desencadenant la mort, o ajudar a la cèl·lula a recuperar-se davant un estrés i a sobreviure (**Figura 2**) (Cohen-Cory *et al.* 2010)(Chao 2003).

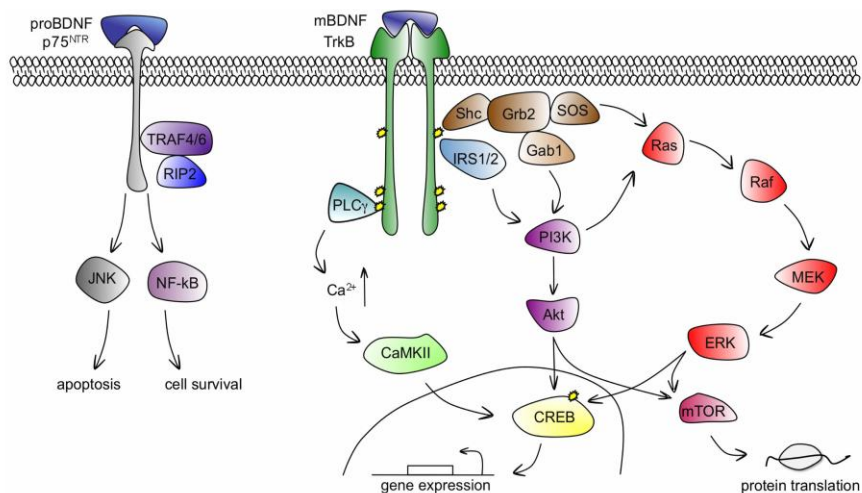


Figura 2. Vies BDNF-TrkB i BDNF-p75. El BDNF s'uneix al TrkB per induir la seva activació i permetre la unió de molècules efectores que activen principalment 3 vies: la PLC γ , la PI3K i l'ERK. Aquestes acaben fosforilant i activant el factor de transcripció

CREB, el qual intervé en la transcripció de gens essencials per a la supervivència i la diferenciació de neurones. D'altra banda, quan el BDNF s'uneix amb baixa afinitat al receptor p75 desencadena apoptosi a través de la cascada de JNK o supervivència a través de la via NF- κ B (Cunha, Brambilla & Thomas 2010).

1.2. Funció del TrkB

El TrkB controla aspectes importants de la formació de les sinapsis GABAèrgiques i de funcions cerebelars, com l'assemblatge i el manteniment de les citades sinapsis. Cosa que suggereix, que una part de la funció del TrkB és promoure l'adhesió sinàptica (Chen *et al.* 2011).

El TrkB s'expressa majoritàriament al sistema nerviós, especialment al neocòrtex, a l'hipocamp i a la substància nigra (Xu *et al.* 2000). L'activitat neuronal facilita l'expressió de TrkB a la superfície cel·lular. Se sap que l'expressió del TrkB està incrementada a l'hipocamp i al còrtex dependent de la seva activitat; així, per exemple, la despolarització de neurones corticals de ratolí augmenta l'expressió del TrkB (Kingsbury *et al.* 2003). Al cerebel l'expressió del TrkB és molt important per regular la diferenciació sinàptica, no només per l'assemblatge sinó també pel manteniment d'aquestes sinapsis, principalment regulant la localització dels constituents sinàptics (Chen *et al.* 2011).

Els ratolins *Knock Out* del TrkB^{-/-} neixen sense grans anormalitats al cervell, però no es desenvolupen bé i no sobreviuen més de 2 o 3 setmanes.

En un ratolí *Knock Out* condicional del TrkB que perd l'expressió del TrkB, especialment als axons i a les dendrites de neurones piramidals del neocòrtex a partir del dia 14 post natal, es demostra que el TrkB és essencial per a la supervivència de les neurones piramidals del neocòrtex però no de l'hipocamp. El KO mostra greus canvis neuro-morfològics com per exemple unes dendrites més primes, el soma més petit i de forma oval, provocant una compressió del neocòrtex a l'edat de 10 setmanes, alterant l'expressió de gens com factors de transcripció importants per a la correcta formació de sinapsis, desencadenant en elles una plasticitat anormal (Xu *et al.* 2000).

A altres ratolins KO condicionals del TrkB, en cèl·lules col·laterals de Schaffer i en cèl·lules granulars de l'hipocamp on no hi ha expressió del TrkB en la pre-sinapsi, el nombre de terminals pre-sinàptiques i el nombre de sinapsis excitables es veuen reduïdes i presenten defectes pre-sinàptics en la

CAPÍTOL I - INTRODUCCIÓ

connectivitat (Luikart *et al.* 2005);(Cohen-Cory *et al.* 2010);(Danzer *et al.* 2008).

El BDNF i el TrkB estan distribuïts àmpliament a través de les subregions de l'hipocamp i del prosencèfal adult (Bramham, Messaoudi 2005). El BDNF es troba a les vesícules secretores tant de l'axó terminal (pre-sinàptic) com en les dendrites (postsinàptic) de les neurones principals glutamaèrgiques (cèl·lules granulars i cèl·lules piramidals) (Lu, Christian & Lu 2008). El BDNF és secretat per les sinapsis actives, les neurones recluten el TrkB de les zones post-sinàptiques i el porten als microdominis de membrana enriquits durant la sinapsi. En aquest moment, l'activitat neuronal promou l'endocitosi del TrkB activat pel BDNF convertint, d'aquesta manera, al TrkB i al BDNF en uns reguladors essencials de la plasticitat sinàptica (Nagappan, Lu 2005). El BDNF podria ser un modulador sinàptic, ja que diferents estudis relacionen la regulació de la transcripció i secreció del BDNF amb l'activitat sinàptica (Lessmann, Gottmann & Malsangio 2003)(Lu 2003)(Lu, Christian & Lu 2008)(Minichiello 2009).

Estudis *in vivo* demostren que el BDNF afecta no només a la morfologia en forma d'arbre de l'axó, sinó també a la forma de la connexió sinàptica dels axons, els quals es tornen morfològicament més complexos en resposta al BDNF. A més, vàries observacions donen suport a la idea que la guia axonal no depèn directament del BDNF, però en canvi la connexió que succeeix quan un axó troba de manera satisfactòria el seu camí sí que en depèn (Cohen-Cory *et al.* 2010). En són una evidència el fet que un KO de l'expressió del TrkB no mostra dèficits en la guia axonal de les principals projeccions aferents en circuits neuronals clau del cervell, incloent l'hipocamp, el cerebel, el còrtex somatosensorial i el sistema visual, tot i que la connexió sinàptica sí que és mostra alterada (Rodger, Frost 2009). De la mateixa manera, un KO (homozigot) del BDNF, on la població neuronal està rescatada de la mort cel·lular a través d'una mutació puntual al gen pro-apoptòtic BAX, mostra projeccions neurals normals (Hellard *et al.* 2004). Finalment, en un ratolí KO condicional del BDNF hi ha un dèficit important en L-LTP, però Lu, Christian & Lu 2008 suggereix que el BDNF no està involucrat en tots els tipus de plasticitat sinàptica de llarg termini.

L'expressió del TrkB sembla ser essencial pel correcte desenvolupament del cor (Wagner, Nebreda 2009)(Lei, Parada 2007).

1.3. Regulació transcripcional del trkB

El gen *trkB* (*NTRK2*, *neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2*) humà i el de ratolí poden codificar per diferents transcrits com a resultat de presentar diferents promotors, *splicing* alternatiu i diferents llocs de poliadenilació. Tot i que generalment es produeixen principalment tres isoformes proteiques en l'humà i dues al de ratolí, les quals són el receptor complet i dues proteïnes truncades en l'humà i una en el cas del de ratolí. A les dues formes truncades els falta el domini quinasa. Una d'aquestes conserva el lloc d'unió al Shc, però l'altre no. Les dues formes truncades són reguladores negatives de la senyalització pel TrkB (Stoilov, Castren & Stamm 2002)(Baretino *et al.* 1999)(Lei, Parada 2007).

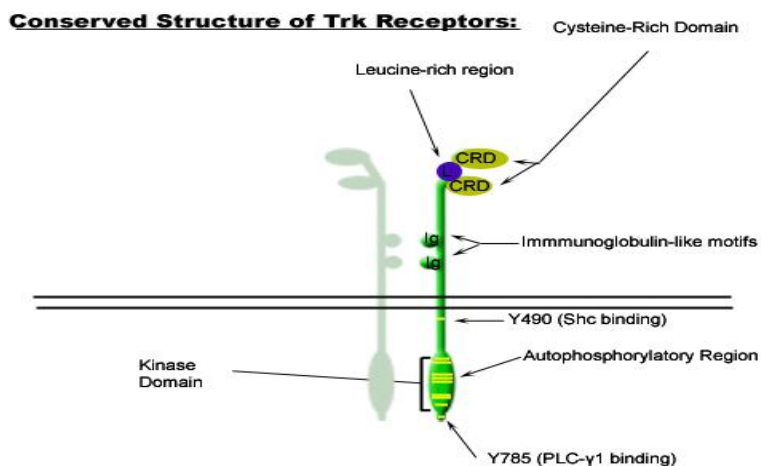


Figura 3. Estructura conservada dels receptors Trk. El Trk A, B o C presenten elements molt conservats entre ells. Es mostren les diferents regions i residus conservats.

(http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=2009_Group_4_Project)

L'expressió del TrkB augmenta en resposta a l'activitat sinàptica (Lessmann, Gottmann & Malcangio 2003), (Lu 2003), (Lu, Christian & Lu 2008).

Al cervell adult, l'expressió del *trkB* respon a estímuls externs. S'ha demostrat un augment ràpid i transitori de l'mRNA del *trkB* quan es

CAPÍTOL I - INTRODUCCIÓ

produeixen danys per isquèmia o per hipòxia, estrès repetitiu i en la fase tardana del LTP a l'hipocamp (Deogracias *et al.* 2004)

Una manera de regular les isoformes del trkB és a través del control dels promotors. Quan les cèl·lules es despolaritzen mitjançant de l'entrada de Ca^{+2} a les neurones corticals de ratolí, es regula la transcripció de la forma sencera del TrkB, però no de la truncada. Això és degut a que el Ca^{+2} regula els elements de resposta presents als promotors, activant-ne els que faran la transcripció sencera i inhibint-ne els de la forma truncada (Kingsbury *et al.* 2003). El CREB es un factor de transcripció que s'uneix al DNA de gens que contenen llocs CRE (*cAMP-response element*). Un dels gens descrits que és activat a través d'aquest sistema és el BDNF. Posteriorment es va demostrar que la via cAMP/PKA estimula l'expressió del gen del trkB a través de la unió del factor de transcripció CREB a un lloc CRE present al promotor P2 del TrkB. (Deogracias *et al.* 2004).

El TrkB està regulat negativament per l'hormona tiroïdal durant el desenvolupament del cervell de rata a través dels elements inhibitoris de resposta de l'hormona tiroïdal (Deogracias *et al.* 2004, Pombo *et al.* 2000)

El factor de transcripció NeuroD (veure més endavant) és important per a l'expressió del TrkB. Les neurones de l'oïda interna són dependents d'aquest factor: els ratolins als que els falta NeuroD no expressen el TrkB ni el TrkC en aquestes neurones i neixen sords degut a l'apoptosi de les citades neurones durant el desenvolupament (Kim *et al.* 2001). Al nostre laboratori es va descriure com les bHLHs E47 i el NeuroD s'unien al promotor del TrkB i del p21, activant-ne la seva transcripció relacionant el cicle cel·lular i la diferenciació (Liu *et al.* 2004).

2. Factors de transcripció HLH

Les proteïnes HLH (*Helix Loop Helix*) són factors de transcripció que conserven el motiu estructural HLH responsable de la seva dimerització. Formen homo- o heterodímers amb ells mateixos o amb altres classes d'HLHs (Murre, McCaw & Baltimore 1989). La subfamília bHLH (*basic Helix Loop Helix*) pot unir-se al DNA a través del seu domini bàsic més pròxim al motiu

HLH (De Masi *et al.* 2011)(Ferre-D'Amare *et al.* 1993). D'aquesta manera regula l'expressió de gens involucrats en molts processos de desenvolupament, com la determinació del llinatge cel·lular, la proliferació i la diferenciació cel·lular, i altres processos essencials en organismes eucariotes de manera molt conservada (Atchley, Fitch 1997);(Murre *et al.* 1989).

Existeixen més de 200 HLH descrites fins al moment. S'han sub-classificat basant-se en la seva distribució tissular, habilitats de dimerització i especificitat d'unió al DNA.

2.1. Classe I

La classe I, són bHLHs (*basic Helix Loop Helix*) conegudes com a proteïnes E (proteïnes E2A (E12, E47), HEB, E2-2, ITF1,TCF-3 i *Daughterless*), s'expressen en molts tipus de teixits, són capaces de formar homodímers amb elles mateixes o heterodímers amb altres HLHs i s'uneixen al DNA exclusivament a través de les seqüències consens de DNA CANNTG (*E-box*) (Ellenberger *et al.* 1994);(Massari, Murre 2000). Quan formen homodímers d'E47 o d'E12 activen gens específics de diferenciació del llinatge de cèl·lules limfocitàries (cèl·lules T i B), a més de cèl·lules dendrítiques plasmàtiques (pDC); en canvi, pel desenvolupament de les NK (un tipus de limfòcits, *Natural Killer*) es requereix la inhibició de les proteïnes E a través de les proteïnes Id (Kee 2009); (Murre, Voronova & Baltimore 1991). Està descrit que la sobreexpressió del gen E2A, els productes del qual són les proteïnes E47 i E12, contribueix al control del cicle cel·lular, bloquejant les cèl·lules en fase G1 (Prabhu *et al.* 1997). Es considera que les proteïnes d'E2A juguen un paper clau en la regulació del creixement cel·lular i la diferenciació de diferents llinatges com limfòcits, múscul i neurones. (Massari, Murre 2000);(Slattery, Ryan & McMorrow 2008)(Peverali *et al.* 1994).

2.2. Classe II

Són també bHLHs però a diferència de l'anterior, la classe II són proteïnes l'expressió de les quals és específica de teixit i són necessàries per a molts processos de desenvolupament en diversos organismes, des

CAPÍTOL I - INTRODUCCIÓ

d'insectes a mamífers. No són capaces de formar homodímers, i generalment heterodimeritzen amb les proteïnes E. Inclou proteïnes com la Tal1, la Hen1, l'eHAND, la dHAND, la neurogenin, la NeuroD, la MATH1, la MASH1 o la MRF (*myogenic regulatory factors*) (Murre, McCaw & Baltimore 1989) (Massari, Murre 2000).

La proteïna SCL/Tal1 és essencial pel desenvolupament dels llinatges cel·lulars hematopoètics, mentre que l'eHAND i la dHAND són essencials per a la correcta morfogènesi del cor, a més de controlar el desenvolupament craniofacial i de les extremitats (Firulli *et al.* 2010);(Massari, Murre 2000). La MASH1, la MATH1, la NeuroD i la neurogenina s'expressen durant el desenvolupament del sistema nerviós i estan implicades en la neurogènesi. L'expressió de la NeuroD és activada per la neurogenina1 i totes dues promouen la generació ectòpica de neurones. La NeuroD promou la sortida del cicle cel·lular en precursors neuronals, actuant, doncs, com un factor de diferenciació (Chae, Stein & Lee 2004). A més la NeuroD (també anomenada Beta2) també està implicada en el desenvolupament pancreàtic, unint-se al promotor de la insulina. La NeuroD dimeritzant amb E47 és capaç d'activar el receptor del BDNF (TrkB) i de l'inhibidor de cicle p21^{cip} (Liu *et al.* 2004). Pel que fa a la MATH1, és necessària pel desenvolupament de les neurones granulars de cerebel, mentre que la MASH1 ho és en les motoneurons i les neurones olfàctòries (Ross, Greenberg & Stiles 2003)(Massari, Murre 2000) (Kageyama *et al.* 1997)(Chae, Stein & Lee 2004)(Johnson 2011). Les MRF són, potser, les més estudiades i inclouen quatre sub-tipus: la MyoD, la MRF-4, la Myf-5 i la miogenina. S'expressen únicament al múscul esquelètic, i comparteixen el 80% d'homologia a la zona bHLH, a més de dues altres regions pròximes al motiu bHLH. Totes quatre són capaces de convertir una línia mesodermal en mioblasts (Blackwell, Weintraub 1990);(Weintraub *et al.* 1991);(Davis, Weintraub & Lassar 1987)(Lluis *et al.* 2005).

2.3. Classe V

Dins de les HLHs, a la classe V, trobem les proteïnes Id (inhibidors de la diferenciació), les quals són reguladores negatives de les bHLHs. Poden inhibir la formació d'heterodímers actius interrompent la formació dels dímers entre les proteïnes E i les proteïnes bHLH específiques de teixit. Donat que els falta el residu bàsic, les Id segresten les proteïnes E2A i eviten que es

puguin unir al DNA i, per tant, eviten dur a terme l'activació transcripcional (Norton 2000).

Les proteïnes Id actuen positivament com a reguladors del creixement cel·lular. La proteïna de retinoblastoma (pRB) uneix factors de transcripció de la família E2F inhibint la seva acció i aturant el cycle cel·lular. L'Id2 interacciona directament amb la pRB i amb les proteïnes relacionades p107 i p130, revertint l'aturada del cycle cel·lular produïda per la unió de la pRB hipofosforilada amb el factor de transcripció E2F (Iavarone *et al.* 1994, Lasorella, Iavarone & Israel 1996).

En cèl·lules quiescents pràcticament no es detecta expressió de gens Id però, per contra, en la fase G1 del cycle cel·lular l'expressió de les Ids va en augment fins al seu màxim a la fase S, moment en què poden rebre senyals mitogènics i inhibir l'expressió de gens d'expressió ràpida específics, com per exemple el c-fos (Norton *et al.* 1998).

Diverses Ids també contribueixen a la progressió del cycle cel·lular impedit l'expressió de l'inhibidor de CDKs p21^{CIP}, el qual té per funció aturar el cycle cel·lular impedit la fosforilació del pRb i per tant no permetent l'alliberació d'E2F (Norton 2000).

2.4. Classes III, IV, VI i VII

La classe III inclou la família de factors de transcripció Myc, TFE3, SREBP-1 i Mi. Aquesta classe conté un domini LZ (cremallera de leucina) adjacent al motiu HLH i s'ha demostrat que és capaç de regular processos com transformació oncogènica, apoptosi i diferenciació cel·lular. La classe IV inclou proteïnes com la Mad, la Max o la Mxi, capaces de dimeritzar amb la Myc. Es mostren repressores quan s'uneixen a les caixes E formant heterodímers entre la Mad o la Mxi amb la Max. La classe VI es caracteritza per tenir una prolina en la seva regió bàsica; inclou proteïnes de la família de les Hes com *Enhancer of split* o *Hairy*, les quals estan descrites com a proteïnes repressores transcripcionals. Finalment, la classe VII es caracteritza per la presència del domini PAS juntament amb el bHLH i inclou proteïnes com l'AHR, l'Arnt i el factor induïble per hipòxia 1 α (Massari, Murre 2000).

3. Estructura i Activitat de l'E47

3.1. Estructura de la bHLH E47

L'E47 i l'E12 són productes proteics resultants del processament alternatiu (*splicing*) del gen E2A. Anàlisis *in-situ* d'RNA mostren que les E2A s'expressen pràcticament en tots els teixits humans, i ho fan en nivells relativament alts en àrees específiques del sistema nerviós central, del teixit limfoide i als músculs. També durant el desenvolupament embrionari els trobaríem al ronyó, als pulmons i a la fel (Slattery, Ryan & McMorro 2008).

Al promotor de les E2A li manquen les caixes convencionals TATA i CAAT i, en canvi, té llocs potencials d'unió per factors de transcripció com el GATA-1/-2, el Sp1, el CREB, l'AP2 o l'E2F. El fet que li falti la caixa TATA el relaciona amb altres gens de les mateixes característiques que acostumen a tenir un lloc d'inici de transcripció variable i una expressió ubiqua en molts teixits (Slattery, Ryan & McMorro 2008). L'E47 té el seu domini bHLH entre els aminoàcids 547 i 605 (Quong *et al.* 1993) i, contigu a aquest, un dels dos senyals de localització nuclear, situat concretament entre els aminoàcids 537 i 557, i anteriorment entre els aminoàcids 159-177 (Mehmood *et al.* 2009). El domini bHLH, a part de permetre la unió al DNA del gen diana, el qual ha de regular la seva transcripció, és el responsable de la seva homo- o heterodimerització, tal i com hem explicat anteriorment.

Tant l'E47 com l'E12, així com les altres proteïnes E, tenen dos dominis d'activació, l'AD1 i l'AD2, que es troben entre els aminoàcids 1-99, i 325-432 respectivament (Aronheim *et al.* 1993, Massari, Jennings & Murre 1996). Al domini AD1 trobem un grup de residus rics en prolines i serines, mentre que el domini AD2 conté un número de residus hidrofòbics i hidrofílics completament conservats repartits en una roda helicoïdal a cada cantó (Massari, Jennings & Murre 1996). El domini AD2 conté una regió entre els aminoàcids 345 i 408 que consisteix en un *loop* adjacent a l'hèlix amfipàtica: el motiu LH, el qual està molt conservat i és suficient per a la seva activació transcripcional (**Figura 4**)(Quong *et al.* 1993).

3.2. Modulació de l'activitat de l'E47

Els dominis d'activació dels factors de transcripció funcionen, essencialment, com a mòduls d'interacció entre proteïnes per reclutar complexos co-reguladors transcripcionals a les zones properes dels promotors dels gens que regulen (Bayly *et al.* 2006). Està comprovat que la CBP i el seu paralog p300 (proteïna de 300kDa associada a l'adenovirus E1A) són proteïnes molt versàtils, ja que tenen diverses funcions com a coActivadors transcripcionals per a un gran nombre d'activadors transcripcionals cel·lulars implicats en la proliferació, la senyalització i la diferenciació, com per exemple l'E12/E47(Shiama 1997)(Massari, Murre 2000);(Qiu, Sharma & Stein 1998). S'ha demostrat que el coactivador p300, (identificat originalment per la seva capacitat d'interaccionar amb la proteïna oncogènica E1A), interacciona amb l'E12 quan està unit al DNA, correlacionant la presència del p300/CBP amb l'habilitat de les bHLH d'activar la transcripció (Eckner *et al.* 1996). El domini AD1 de l'E47 necessita una conformació helicoïdal, que obté de la seva interacció amb CBP/p300, per tal de poder reclutar altres co-reguladors transcripcionals i fer la seva funció com a factor de transcripció (Ugai *et al.* 1999). El p300 té l'habilitat de potenciar la transcripció de l'E47 no només a través de l'AD1 sinó també dels dos dominis d'activació AD1 i AD2 (Qiu, Sharma & Stein 1998).

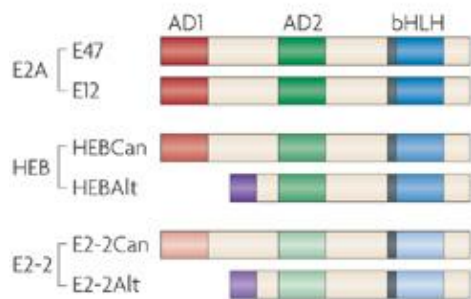


Figura 4. Esquema de les proteïnes E i els seus dominis. Es mostren la distribució dels dominis d'activació AD1, AD2 i del domini bHLH. Transcripcions (Alt) alternatives, (Can) canonical, (Kee 2009).

CAPÍTOL I - INTRODUCCIÓ

Hi ha proteïnes que poden regular l'activitat de les proteïnes E2A. Les Ids, tal com ja hem explicat anteriorment, s'uneixen a les E2A inhibint l'activitat transcripcional dels gens diana. Les Ids juguen un paper clau en la regulació del llinatge cel·lular, en les decisions del destí cel·lular, en la diferenciació durant la neurogènesi, en la limfopoiesi i en l'angiogènesi. Actuen especialment en els gens de senyals mitogènics, afecten positivament a la progressió del cycle cel·lular i n'obstaculitzen la diferenciació. Per exemple, quan s'uneixen a l'E47 o a l'E12 en un context de diferenciació neuronal, impedeixen la formació del dímer NeuroD-E47 i la unió a les caixes E del promotor de l'inhibidor de cycle p21 i per tant permeten la progressió del cycle cel·lular (Liu *et al.* 2004, Norton 2000)(Liu *et al.* 2004, Norton 2000, Neufeld *et al.* 2000).

Una altra molècula reguladora és el substrat c-Jun de la via de les JNK. El c-Jun pot reprimir la transcripció del gen de la insulina en cèl·lules β pancreàtiques. Aquest procés es dona quan el c-Jun inhibeix el potencial transactivador de les proteïnes E47/E12 en reduir l'activitat del seu domini AD2. En condicions normals l'E47/E12, juntament amb el factor activador de la insulina (INSAF) formen el complex activador ICE; el complex produït s'uneix al promotor del gen *insulin enhancer*, activant la traducció de la proteïna resultant, la qual s'uneix al gen de la insulina activant la seva transcripció (Robinson *et al.* 1995).

Diversos autors han descrit com l'activitat transcripcional de les E2A pot estar modulada per la seva fosforilació a diferents nivells i en diferents contextos cel·lulars. L'estat de fosforilació de l'E47 pot determinar la seva activitat transcripcional. Al llinatge cel·lular de les cèl·lules B es requereix homodimerització de l'E47 hipofosforilat. Si els dos dímers de l'E47 estan fosforilats a les serines 514 i 529 perden la capacitat d'unió al DNA, mentre que si només ho està un d'ells encara s'hi pot unir i, en conseqüència, activar la transcripció dels gens candidats (Sloan *et al.* 1996). Aquest sistema funcionaria també en alguns casos concrets potenciant la formació d'heterodímers, on l'E47 fosforilat evitaria la formació d'homodímers i n'alliberaria per formar heterodímers. En un altre cas es descriu com la quinasa p38 fosforila l'E47 a la serina 140, evitant l'homodimerització i regulant l'heterodimerització de l'E47/MyoD, que controlen la transcripció de gens específics de diferenciació muscular (Lluis *et al.* 2005).

D'altra banda, però, s'ha observat que la p38, a través de la via MEKK1, fosforila *in vitro* l'E47 fora dels dominis d'activació, a les treonines 69 i 71, inhibint l'activitat transcripcional del complex E47-MyoD i, en conseqüència, la miogènesi sense afectar l'heterodimerització del citat complex ni la seva unió al DNA (Page *et al.* 2004). La quinasa caseïna II (*Casein Kinase II*) fosforila l'E47 i evita la seva homodimerització, augmentant la seva activitat transcripcional en gens miogènics quan heterodimeritza amb les MRF (*myogenic regulatory factor*) (Johnson *et al.* 1996).

Se sap que la fosforilació de l'E47 pot reprimir la seva activitat transcripcional. En experiments utilitzant vectors amb el gen de la luciferasa com a reporter sota el control del promotor que conté caixes E, es descriu com la fosforilació de l'E47 per les quinases 3pK i MK2 (MAPKAP-K2) reprimeixen l'activitat transcripcional d'aquesta (Neufeld *et al.* 2000).

Les proteïnes E2A es regulen negativament a través de la via ubiquitina-proteasoma. La fosforilació dels residus serines 514 i 529 al costat N-terminal del domini bHLH d'E47 per la *casein kinase II* i per la proteïna quinasa A, fa que els homodímers d'E47 perdin l'habilitat d'unir-se al DNA (Sloan *et al.* 1996)(Slattery, Ryan & McMorrow 2008). El domini intracel·lular de Notch incrementa la ubiquitinització de l'E47 fosforilat seguit per la degradació d'aquesta, via el complex proteasomal (Nie *et al.* 2003, King *et al.* 2007).

3.3. Localització de l'E47

Algunes evidències suggereixen que regulant la localització dels factors de transcripció es contribueix a la regulació de la seva activitat durant el desenvolupament.

A nivell molecular, la regulació de l'abundància proteica localitzada de manera específica suggereix una manera complementària a les interaccions post-traduccionals de regular la funció de les E2A. L'E47 presenta una localització nuclear (Rutherford, LeBrun 1998), tot i que s'ha demostrat que quan dimeritza amb la seva bHLH companya especialitzada en diferenciació neuronal, la NeuroD, ho fa al citoplasma, i d'allà són importades com un sol complex al nucli (Mehmood *et al.* 2009). L'E47 presenta dos dominis de

CAPÍTOL I - INTRODUCCIÓ

localització nuclear (Lingbeck *et al.* 2005) i és gràcies a ells que és importat al nucli en presència de l'activitat GTPasa RAN. Tot i que la NeuroD *per se* també mostra una localització nuclear, l'E47 millora aquesta localització de la seva proteïna companya, la NeuroD (Mehmood *et al.* 2009).

4. *Mixed Lineage Kinases*

4.1. Activació de les vies de MAPK: JNK, P38 i ERK

Les MLKs (*Mixed Lineage Kinases*) es troben en tots els eucariotes superiors. Són una família de serines/treonines quinases que actuen en vies complexes de transducció de senyal. D'aquesta manera controlen l'activitat d'algunes proteïnes quinasa activades per mitògens (MAPK). Pertanyen a la súper-família de les proteïnes quinasa-quinasa-quinasa activades per mitògens (MAP3K, MAPKKK), la qual dirigeix processos tant diversos com la mort cel·lular programada, la mitosi, el metabolisme o la motilitat (Handley *et al.* 2007), (Gallo, Johnson 2002), (Johnson, Lapadat 2002).

Les MLKs activen diferents vies de les MAPKs com la de JNK, la de p38 i la d'ERK. Se sap que les MLKs fosforilen i activen la via apoptòtica c-Jun/JNK a través de la MKK4/7 (Merritt *et al.* 1999, Handley *et al.* 2007, Wang, Besirli & Johnson 2004). A més, també poden activar la via de la p38, implicada en la inflamació, el cicle cel·lular, la diferenciació cel·lular i la tumorigènesi (Zarubin, Han 2005)(Handley *et al.* 2007). La MLK3 (sense necessitat de l'activitat quinasa) pot formar part d'un complex multiproteic que es requereix per a l'activació de la via ERK a través de l'activació per mitògens de la B-Raf, involucrada en proliferació cel·lular (Chadee *et al.* 2006). Està comprovat que la MLK2 activa principalment la JNK1, és capaç d'activar en força grau l'ERK2 i de forma més moderada la p38 (Hirai *et al.* 1997).

4.1.1. Classificació i estructura de les MLKs

El nom MLK, *Mixed Lineage Kinase*, prové del fet que, dels 11 subdominis conservats a les proteïnes quinases, del domini 1 al 8 s'assemblen a les quinases serina/treonina (particularment les MEKKs i la

Raf), mentre que les regions del 9 al 11 comparteixen similitud amb les quinases tirosina, com el receptor del FGF i el Src (Gallo, Johnson 2002, Turjanski, Vaque & Gutkind 2007). De totes maneres, fins ara només s'ha observat que fosforil·lin en residus serina o treonina (Zhao, Manser 2005).

Fins al moment, es coneixen nou tipus de MLKs en mamífers, les quals s'han classificat en tres subfamílies (**Figura 5**) basant-se en l'organització del seu domini i homologia de seqüència:

- 1) Les MLKs, on s'inclouen la MLK1, 2, 3 i 4 α i β .
- 2) Les DLKs (*Dual Leucine Zipper-Bearing Kinases*), on s'inclouen les DLKs i la LZK (*Leucine Zipper Kinase*).
- 3) Les ZAKs (*Zipper Sterile-a-Motif kinase*), que inclouen la ZAK α i la ZAK β (Handley *et al.* 2007), (Wang, Besirli & Johnson 2004).

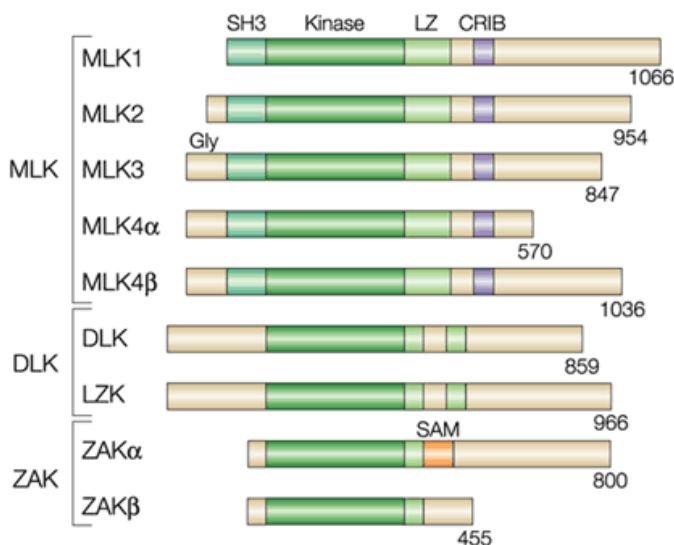


Figura 5. Estructura de les MLKs humanes. Dominis conservats entre la família de les MLK. Es mostra la localització del SH3 (*Src homology3*), el domini cremallera de les leucines (LZ) i el domini CRIB (*Cdc42/Rac Interacting binding*) o el cas de ZAK α SAM (*Steril a motive*) (Gallo, Johnson 2002).

Totes nou MLKs, a més del domini quinasa, tenen també un o dos dominis cremallera de leucines que faciliten les interaccions hidrofòbiques amb proteïnes. Les MLK1-4 comparteixen una gran homologia entre elles; a més del domini quinasa, trobem en els seus primers 500 aminoàcids de l'N-

CAPÍTOL I - INTRODUCCIÓ

terminal, un domini SH3 (*Src homology motive 3*), una regió rica en prolines i un domini CRIB (*cdc42-Rac interactive binding motif*), el qual interacciona amb el cdc42 i el rac. En canvi, la regió del C-terminal és molt poc homòloga i difereix molt de mida entre les MLKs. Aquest fet fa suposar que el C-terminal de les MLK1-4 és el que determinarà l'especificitat de les seves interaccions amb altres proteïnes. (Handley *et al.* 2007, Gallo, Johnson 2002);(Xu *et al.* 2001).

4.2. Activació de les MLKs

Se sap que el domini SH3 de la MLK3 auto-inhibeix la seva activitat quinasa. Aquesta inhibició sembla deguda a que el domini SH3 de la MLK3 s'uneix intramolecularment a una regió conservada de les MLKs entre el domini cremallera de leucina i el motiu CRIB. Anàlisis de l'estructura i de seqüència del domini SH3 mostren 3 aminoàcids aromàtics altament conservats. La substitució de qualsevol d'aquests residus a un residu alanina al domini SH3 de la proteïna adaptadora Sem-5/Grb2 evita la unió de les seves dianes riques en prolines. A la MLK3, els residus conservats corresponents al domini SH3 són Y⁵², W⁸³ i Y⁹⁹ (Zhang, Gallo 2001). El mateix autor demostra que mutacions de la tirosina 52 al domini SH3 eviten la unió a la regió adequada i augmenten la seva activitat quinasa. La tirosina crítica del domini SH3 (Y⁵²) es conserva tant a les MLK1-4 com al DLK, suggerint un mecanisme comú d'autoinhibició entre les quinases.

4.3. Dimerització, activació, interacció amb els substrats i fosforilació

La MLK3 necessita ser fosforilada per ser activa. A més de la fosforilació per les quinases activadores, hi ha evidències que l'activació de les MLK passa a través de la dimerització i l'autofosforilació (Leung, Lassam 2001). Les MLK1-4 presenten el 75% d'homologia de seqüència dins del seu domini catalític i un 65% al motiu CRIB i les zones flanquejants del domini SH3 (Zhao, Manser 2005) (Gallo, Johnson 2002), per això sembla raonable pensar que l'activació d'aquestes es produeixi d'igual manera (Handley *et al.* 2007). La MLK3 interacciona i s'activa amb les proteïnes d'unió a GTPases Cdc42 i a Rac1, (Bock *et al.* 2000);(Teramoto *et al.* 1996) i amb la RhoG

(Wennerberg *et al.* 2002), sent capaç d'activar la cascada de la JNK i del p38. Aquesta interacció es dona mentre la proteïna MLK3 no es troba fosforilada, ja que un cop activada no es detecta la seva interacció (Handley *et al.* 2007). No es coneix exactament el mecanisme pel qual la unió del cdc42 activa la MLK3. Atès que s'han trobat dos llocs autofosforilables induïbles pel cdc42 a la MLK3, una hipòtesi seria que l'associació del domini CRIB amb les proteïnes d'unió a GTP evitarien l'autoinhibició produïda pel domini SH3, permetent la dimerització i l'autofosforilació. Una altra hipòtesi seria que, ja que el cdc42 es localitza al citoesquelet i als elements de les membranes cel·lulars, podria estar reclutant la MLK3 i portar-la prop d'una quinasa que la fosforilés i l'activés.

Les MLKs i les DLKs contenen una cremallera de leucines (LZ), la qual mostra un 70% de la seqüència idèntica entre les MLK1-4 i només un 35% amb les DLK, però totes mostren la mateixa funció: la LZ regula la dimerització de les MLKs i la inducció de la dimerització promou l'autofosforilació, estat necessari per activar-se (Vacratsis, Gallo 2000). Es creu que l'expressió de les Cdc42 activades podria ajudar a la dimerització de la MLK3, ja que les Cdc42 ajuden a l'autofosforilació d'aquesta. Se sap que la MLK3 amb disruptions al motiu cremallera de leucines és capaç encara d'autofosforilar-se, però no és capaç d'activar el seu substrat MKK4, ja que no pot interaccionar amb els seus substrats i, per tant, no els pot fosforilar (Gallo, Johnson 2002). Alguns autors creuen que l'heterodimerització és possible, permetent a algunes MLKs induir l'activació de la MAPK en resposta a diferents senyals de nivells superiors a la via (Leung, Lassam 1998), tot i que aquest punt de vista no és acceptat per tothom. Les proteïnes JNK *interacting protein* (JIPs) són proteïnes *scaffold* que interaccionen amb les MAPK a diferents nivells de la via. La JNK, la MKK7 i les MLKs s'uneixen a diferents regions de la JIP-1 (Xu *et al.* 2001) suggerint que la JIP-1 ajudaria no solament a un ancoratge correcte i en la orientació adequada de les proteïnes, sinó que també regularia l'activitat de la transducció de senyal de les MAPK. Aquestes proteïnes podrien aportar una possible explicació a l'heterodimerització d'algunes MLKs (Handley *et al.* 2007).

Tal com hem dit anteriorment, les MLKs necessiten estar fosforilades per ser actives. Dins del domini catalític es troba el *loop* d'activació de moltes quinases. En aquest domini es troben molts llocs fosforilables per a la seva

CAPÍTOL I - INTRODUCCIÓ

regulació. En totes les MLKs de mamífers es troba la seqüència S/TXXXS, present també a la MLK3 com a TTXXS on s'ha demostrat que són llocs per a la seva autofosforilació. A part d'aquesta zona, s'han trobat 11 llocs més fosforilables *in vivo* a la MLK3, majoritàriament a la part C-terminal de la proteïna. El fet de trobar una prolina just abans de 7 d'aquestes seqüències podria indicar que la MLK3 podria ser una quinasa dirigida per prolines com les MAPKs i les cdk (cyclin-dependent kinases) (Vacratsis *et al.* 2002). S'ha observat que les MLKs es poden fosforilar com a conseqüència d'un *feedback* positiu de la JNK i podrien tenir implicacions decisives i irreversibles durant el desenvolupament i apoptosi. A més, a les MLKs es troben tants dominis de regulació diferents que es suggereix que aquestes proteïnes es regulen de manera diferent i participen en interaccions proteiques concretes segons l'estímul que reben.

4.4. Localització de les MLKs

Se sap que la MLK2 co-localitza amb la JNK activa i amb diferents estructures associades a microtúbuls. La proteïna motora kinesina-1 transporta les JIP-1-4 (Bowman *et al.* 2000, Nagata *et al.* 1998), les quals s'acumulen prop de la membrana citoplasmàtica on, possiblement, transporta la MAPK a prop de la membrana cel·lular per a la seva activació, i després la KIF1 juntament amb les JIPs i MAPK viatgen fins al nucli dissociant-se de la seva proteïna bastida JIP, on acabarà fosforilant el substrat final, com per exemple el c-Jun. Així, tal com descriuen els experiments de Hirai *et al.* 2002 on es mostra co-localització a través de microtúbuls amb la DLK en forma d'estructures puntejades, es pot concloure que les proteïnes JIP podrien intervenir en la regulació dels complexos de les vies de les MAPK a través de la localització i transport sub-cel·lular. A més, també podrien estar regulant algun procés cel·lular associat a microtúbuls, com és el cas de la MLK3 localitzada als centrosomes, desestabilitzant-los quan és activa i així permetent la fase M del cicle cel·lular (Handley *et al.* 2007). En certes condicions la MLK2 també s'associa amb microtúbuls. La proteïna motora als microtúbuls, KIF3, interacciona amb la MLK2 (Nagata *et al.* 1998). La KIF3 és una proteïna que es desplaça pels microtúbuls carregant diferents proteïnes o complexos que trasllada a través del citoplasma. Les MAPK, a través de la seva localització, poden inhibir o permetre l'activitat

transcripcional d'alguns factors de transcripció, per exemple promovent la seva retenció al citoplasma quan estan fosforilades (Turjanski, Vaque & Gutkind 2007).

No totes les MLKs s'expressen a tots els teixits; algunes depenen del tipus cel·lular o de teixit, i altres en canvi s'expressen ubiqüïtínamment. Per exemple, la MLK2 i la DLK s'expressen sobretot al cervell, mentre que l'expressió de la MLK3 és més extensa, fet que reforçaria la idea que la part C-terminal de les MLK1-4 és la que interacciona específicament amb altres proteïnes, donant-li una funció concreta segons qui sigui la seva interactora (Handley *et al.* 2007, Gallo, Johnson 2002, Phelan *et al.* 1999);(Xu *et al.* 2001).

Durant el desenvolupament del còrtex neuronal de ratolí s'ha observat l'expressió de la DLK, la qual, a través de la via DLK-JNK, regula la migració de les cèl·lules neuronals (Hirai *et al.* 2002).

4.5. Funcions de les MLKs

Les MLKs juguen un paper clau en la senyalització, especialment en l'apoptosi del sistema nerviós (Wang, Besirli & Johnson 2004, Gelbard *et al.* 2010)(Masaki *et al.* 2003)(Mata *et al.* 1996), així com també al cicle cel·lular on, en la fase G2/M, hi ha una clara reorganització dels microtúbuls citoplasmàtics, moment en què la MLK3 s'allunya de la seva localització centromèrica i desestabilitza els microtúbuls citoplasmàtics (Swenson, Winkler & Means 2003). També està descrit que les MLKs tenen importància en el transport vesicular, en l'endocitosi, en la formació del citoesquelet (Gallo, Johnson 2002), en estrès cardíac (Ola *et al.* 2010) i en el sistema immunitari (Handley *et al.* 2007). S'ha demostrat que la MLK2 interacciona amb la clatrina i regula el transport de les vesícules revestides amb clatrina (Akbarzadeh *et al.* 2002). A més, algunes teories apunten a que també estan involucrades en embriogènesi, on podrien tenir funcions similars a la seva homòloga Slpr en *Drosophila* (Gallo, Johnson 2002).

4.6. Substrats de la MLK2

La MLK2 (MAP3K10, MEKK10 o MST), ha estat identificada tradicionalment com una MAP3K activadora de les vies JNK, ERK2 i p38

CAPÍTOL I - INTRODUCCIÓ

(Handley *et al.* 2007, Wang, Besirli & Johnson 2004, Hirai *et al.* 1997, Gallo, Johnson 2002). L'especificitat de la resposta de la MLK2 està relacionada amb la interacció i la fosforilació d'altres proteïnes diferents de les MAPK, com la NeuroD i l'Alien, implicades en processos molt divergents segons el seu context molecular.

4.6.1. La NeuroD

Tal com hem explicat anteriorment, la NeuroD és un factor de transcripció bHLH que pertany a la classe II, el qual pot dimeritzar amb l'E47 per l'activació de gens específics de neurogènesi.

A la malaltia neuronal degenerativa de Huntington, la proteïna huntingtina (Htt) presenta més de 35 repeticions de glutamina, mentre que quan l'expressió és normal, aquestes cues de glutamina no passen de 28 (Walker 2007).

S'ha demostrat en embrions de *Xenopus* que la proteïna Htt, juntament amb la proteïna 1 associada a huntingtina, HAP1, facilita l'activació de la proteïna bHLH NeuroD en un context neuronal. Per assolir-ho, aquestes proteïnes formen una bastida (*scaffold*) per la proteïna MLK2 i d'aquesta manera la MLK2 fosforila la NeuroD (**Figura 6**) (Marcora, Gowan & Lee 2003).

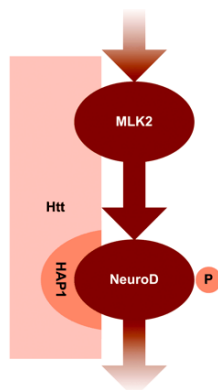


Figura 6. Model de la proteïna huntingtina com a bastida per la fosforilació de la NeuroD per la MLK2 (Marcora, Gowan & Lee 2003).

D'altra banda la proteïna huntingtina s'ha demostrat que interacciona amb la MLK2 activant a nivells basals necessaris la via JNK. Quan es produeix

la malaltia de Huntington, aquesta proteïna és defectuosa presentant 35 repeticions de glutamina a la part N-terminal de la proteïna, fet que afebleix la interacció amb la MLK2, i permet una lliure circulació de la MLK2 activada a la cèl·lula, i per tant la inducció de la via JNK desencadena l'apoptosi a les cèl·lules neuronals amb huntingtina defectuosa i una alliberació de factors tòxics a les cèl·lules circumdants que també els acaba produint la mort apoptòtica (Liu, Dorow & Marshall 2000).

4.6.2. Alien

L'Alien està descrit com un corepressor del receptor de l'hormona tiroïdal (TR) i del DAX-1, tots dos pertanyents a la família de receptors nuclears. L'Alien interacciona amb la MLK2 i és fosforilat per aquesta última, augmentant-ne l'activitat corepressora i, com a conseqüència, el silenciament transcripcional. D'aquesta manera demostren que les vies de senyalització no només regulen la transactivació, sinó també la repressió de gens determinats durant el procés de diferenciació neuronal (Eckey *et al.* 2003).

4.7. Inhibidors de les MLKs

La CEP-1347 i la CEP-11004 són unes molècules semi-sintètiques desenvolupades per la companyia *Cephalon Incorporated* a partir de la K252a, una molècula petita heterocíclica amb propietats neurotròfiques i efectes de supervivència neuronal que és produïda per una bactèria gram positiva d'actinomicets. Aquest fàrmac funciona de diferent manera a diferents dosis; a dosis altes inhibeix les neurotrofines, mentre que a concentracions més baixes promou la supervivència (Knusel *et al.* 1992)(Wang, Besirli & Johnson 2004) (Handley *et al.* 2007). Les CEP-1347 i CEP-11004 han estat descrites com unes bones inhibidores de les MLKs, evitant l'activació de la resta de la via JNK. A més, han estat desenvolupades de manera que no són citotòxiques fins a 400nM (Wang, Besirli & Johnson 2004, Gallo, Johnson 2002, Maroney *et al.* 1998, Saporito *et al.* 1999, Harris *et al.* 2002, Wang, Paden & Johnson 2005, Wang *et al.* 2010).

Tant les neurones del gangli superior cervical (SCG) com les neurones simpàtiques són dependents de la NGF per sobreviure. Una manca d'aquesta neurotrofina les porta a una mort cel·lular programada

CAPÍTOL I - INTRODUCCIÓ

dependent de caspases. Quan hi ha una falta de NGF, baixen els nivells del TrkA fosforilat a les SCG i, en conseqüència, baixen l'activació de les vies ERK i PI3-K; per contra, augmenta l'activació de la via de JNK. La CEP-1347 a 200nM inhibeix l'acció de la JNK inhibint la fosforilació de la MKK4 i la c-Jun en neurones mancades de NGF (Harris *et al.* 2002). Les neurones granulars de cerebel postnats de rata s'han de mantenir amb potassi i sèrum, i la seva falta produeix apoptosi que queda inhibida amb el tractament de la CEP-1347 a 400nM (Wang, Besirli & Johnson 2004). D'altra banda, l'inhibidor de la mateixa família CEP-11004 indueix un augment de fins a 3 vegades els nivells de mRNA i de proteïna del TrkA (receptor de NGF) en cèl·lules neuronals simpàtiques mancades de NGF (*Nerve growth factor*). També indueix un augment del TrkB, receptor del BDNF, en neurones granulars postnats de rata deprivades i, en ambdós tipus cel·lulars, un augment de l'activació de la via de supervivència PI3-K. En neurones granulars postnats de rata privades de potassi i sèrum, la inhibició de la MLK permet sobreviure a les neurones només de manera temporal, aconseguint una supervivència a llarg termini amb l'addició del factor BDNF (Wang, Paden & Johnson 2005).

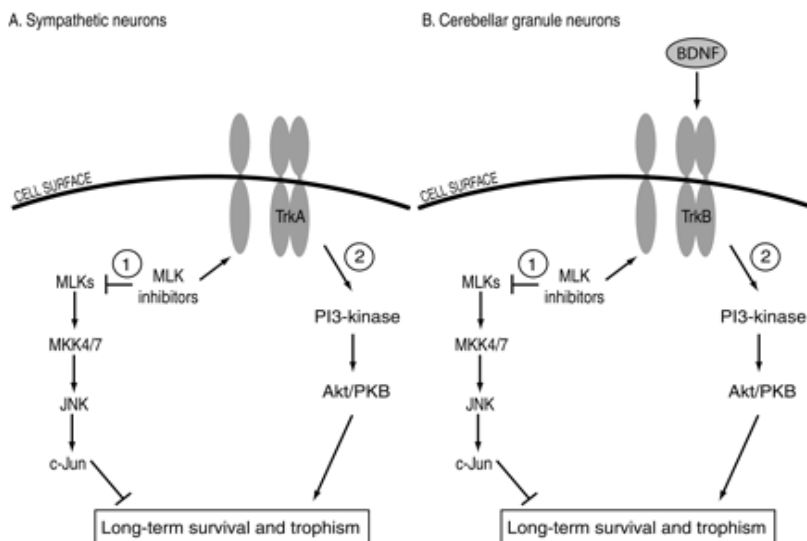


Figura 7. L'expressió del Trk augmenta a l'afegir a les cèl·lules la CEP-11004. Per aconseguir supervivència neuronal es necessita la inhibició de la via de la JNK i l'activació de la via del PI3K. Els inhibidors de les MLKs activen la PI3K a través d'un augment del Trk. En neurones simpàtiques, aquest augment és independent del lligant del TrkA (A), mentre que en neurones granulars de cerebel l'augment del TrkB és dependent del BDNF (Wang, Paden & Johnson 2005).

El tractament amb la CEP-11004 i la CEP-1347 fa disminuir de manera significativa la toxicitat produïda per les cèl·lules PC12 amb la proteïna Huntingtina mutada de la mateixa forma que a la malaltia de Huntington. A més a més, la CEP-1347 és capaç de millorar el rendiment motor en ratolins R6/2 (ratolins transgènics model de la malaltia de Huntington) i restablir-hi l'expressió del factor neurotròfic BDNF, el qual es troba reduït en la malaltia de Huntington (Apostol *et al.* 2008).

5. Efecte de les MLKS en càncer i en malalties neurodegeneratives

L'apoptosi és un mecanisme essencial en l'homeòstasi cel·lular i per tant en la regulació fisiològica de l'organisme. La desregulació de l'apoptosi per mecanismes induïts genèticament o mediambiental, porta a una varietat de patologies tant pro-apoptòtiques, (malalties autoimmunes i neurodegeneratives), com anti-apoptosi, o acumulació cel·lular exagerada (càncer) (Harguindey *et al.* 2008).

La mort programada per apoptosi té funcions importants al sistema nerviós central i és essencial per ajustar la mida de la població neuronal, així com per assegurar que es formen les connexions adequades entre neurones i les dianes d'aquestes (Xu *et al.* 2001, Yuan, Yankner 2000, Kristiansen *et al.* 2010, Mota *et al.* 2001). Però quan aquesta mort es descontrola i s'accentua, apareixen patologies associades amb la demència senil (Gelbard *et al.* 2010). Al món es considera que al voltant de 24×10^6 persones pateixen algun tipus de demència, majoritàriament amb poques teràpies funcionals (Ballard *et al.* 2011). Aquestes patologies estan associades amb una gran mortalitat neuronal a través de l'activació de la via JNK (Wang, Besirli & Johnson 2004).

S'ha demostrat en models de ratolí *in vivo* que expressen la malaltia d'Alzheimer, de Parkinson i de Huntington que la inhibició de les MLKS és una bona prevenció de la mort neuronal. La CEP-1347 i la CEP-11004 han estat descrites com unes bones inhibidores de les MLKS, evitant l'activació de la resta de la via i mostrant propietats neuroprotectores importants (Estus *et al.*

CAPÍTOL I - INTRODUCCIÓ

1994) (Maroney *et al.* 1998)(Saporito *et al.* 1999)(Harris *et al.* 2002)(Gallo, Johnson 2002)(Wang, Besirli & Johnson 2004, Wang, Paden & Johnson 2005) (Gelbard *et al.* 2010).

S'han fet assaigs clínics amb la CEP-1347 pel tractament de la malaltia de Parkinson que han arribat fins a fase clínica II/III, però amb unes conclusions negatives: Segons l'equip que va fer l'assaig clínic, es va arribar a la conclusió que la CEP-1347 era un tractament inefectiu en pacients amb la malaltia de Parkinson que encara no requerien una teràpia dopaminèrgica (Parkinson Study Group PRECEPT Investigators 2007). D'altra banda, s'han continuat fent estudis amb aquests inhibidors amb models animals i cel·lulars en el tractament d'altres malalties que implicaven l'activació de la via de la MLK, donant resultats positius en malalties com la de Huntington (Apostol *et al.* 2008), (Conforti *et al.* 2008), l'hipòxia neonatal (Carlsson *et al.* 2009), la hipertròfia cardíaca (Ola *et al.* 2010) i la SIDA (Eggert *et al.* 2010).

És ben sabut que la manca de factors tròfics, així com alguns estímuls d'estrès extracel·lulars, indueixen apoptosi en les cèl·lules neuronals. Alguns estudis indiquen que les MLK2,3 i la DLK són activades per la MAP3K quan hi ha una privació de factors tròfics, cosa que condueix a mort per apoptosi (Xu *et al.* 2001, Liu, Dorow & Marshall 2000, Mota *et al.* 2001). D'altra banda s'ha mostrat en estudis *in vivo* que ratolins *Knock Out* per les proteïnes MLK2 i MLK1 són viables, fèrtils i mostren una vida completament normal. A més, tampoc no es veu afectada la programació de mort cel·lular en desenvolupament neuronal, suggerint que entre els membres de la família de les MLKs hi ha funcions redundants (Bisson *et al.* 2008). En canvi, els ratolins als quals els manca l'expressió del gen *Jnk3* mostren una susceptibilitat inferior a la mort neuronal per apoptosi (Yang *et al.* 1997). A part de la regulació de l'activació del JNK a través de la MLK2 i 3 en neurones, la via de JNK té funcions independents de la inducció per apoptosi; per exemple, en neurones que se les ha privat de la NGF, la resposta apoptòtica segurament predomina perquè es perden senyals de pro-supervivència, les quals involucren l'activació de la via Akt (Gallo, Johnson 2002) (Kristiansen *et al.* 2010).

En l'ús terapèutic de la CEP-1347 en un assaig clínic es va mostrar que la inhibició de les MLKs no produïa una elevació de la probabilitat de

desenvolupar un càncer (Schwid *et al.* 2010). D'altra banda, s'ha demostrat en diverses ocasions que l'expressió de proteïnes pro-apoptòtiques com les MLKs en cèl·lules canceroses ajuda a evitar progressions tumorals a través de la seva funció apoptòtica (Mc Gee *et al.* 2002). Les tres formes proteiques de les JNK (JNK1 JNK2 i JNK3) poden actuar en funcions pro- i anti- oncogèniques depenent del tipus cel·lular i de l'estadi de desenvolupament en el que es trobi el càncer (Wagner, Nebreda 2009). Per exemple, Cho *et al.* 2004 descriu que en cèl·lules que sobreexpressen la proteïna relacionada amb les MLKs, la MLTK- α forma fibrosarcomes, i quan aquesta proteïna està silenciada aquests efectes són revertits. Aquest seria un dels primers casos en què es descriu una MLK no implicada en la mort apoptòtica sinó en la progressió tumoral. A més a més, (Mishra *et al.* 2010) descriu recentment la implicació de la MLK3/JNK1 en l'activació de la *Gastrina G-17*, una hormona responsable de la migració cel·lular en càncer gàstric.

D'altra banda es coneix l'efecte antagònic de la c-Jun contra l'activitat pro-apoptòtica de la p53 (Eferl *et al.* 2003) en càncers de fetge. En aquest mateix tipus de càncer, en carcinoma hepatocel·lular (HCC), per la seva proliferació i neovascularització, es requereix una reducció d'expressió de la JNK1 que ve donada per la reducció de l'expressió de la MYC i l'augment de l'expressió de l'inhibidor de les CDKs i la p21. La deleció de la JNK1 sembla ajudar a la formació de tumors intestinals i de pell, mentre que la JNK2, en canvi, sembla actuar com un oncogen (Wagner, Nebreda 2009).

OBJECTIUS

Tot i que el *trkB* és un gen que com s'ha explicat anteriorment ha estat objecte d'estudi de molts laboratoris, es coneixen molt poc els mecanismes moleculars que regulen la seva expressió. Per això la nostra hipòtesi de treball d'aquesta part de la Tesi va ser identificar i estudiar la funció dels complexos transcripcionals que regulen l'expressió del *TrkB*, comparant un model de proliferació vs un model de diferenciació neuronal.

6. OBJECTIUS

Estudiar els mecanismes moleculars que regulen l'expressió del receptor *TrkB*.

- a) Identificar proteïnes que interaccionen amb el factor de transcripció E47.
- b) Determinar la funció de les proteïnes identificades en l'apartat anterior en el procés de diferenciació neuronal.

RESULTATS

7. Identificació de proteïnes que interaccionen amb l'E47

Per assolir el primer objectiu del capítol I de la Tesi vam utilitzar cèl·lules de la línia SHSY-5Y que expressaven d'una manera estable els dominis N-terminal o C-terminal de l'E47 fusionats a l'epítot TAP (*veure Materials i Mètodes*). Vam prescindir d'utilitzar la línia que expressava la proteïna E47-TAP degut als baixos nivells d'expressió. Als nostres experiments vam treballar amb cèl·lules proliferant i cèl·lules tractades amb àcid retinoic durant 5 dies degut a que en un treball previ (Encinas *et al.* 2000) s'havia demostrat que després del tractament amb àcid retinoic els nivells d'expressió del TrkB augmentaven.

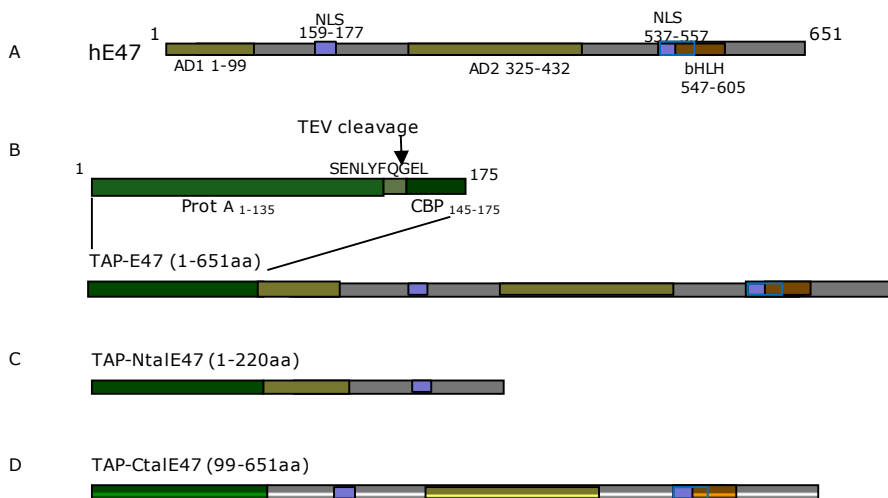


Figura 8. Construccions utilitzades en la purificació de proteïnes per doble afinitat a E47 (TAP, Tandem Affinity Purification). (A) Esquema dels diferents dominis d'E47 on AD1 i AD2 són dominis d'activació, NLS són dominis de localització nuclear i bHLH és el motiu *basic Helix Loop Helix*. (B) Esquema de la fusió de l'epítot TAP a la proteïna E47 humana. L'epítot TAP conté un fragment que codifica per la proteïna A, una seqüència d'unió de la proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*) i un lloc d'unió a Calmodulina (CBP, *Calmodulin Binding Peptide*). (C) Esquema de la fusió de l'epítot TAP a la part N-terminal de la proteïna E47 humana. (D) Esquema de la fusió de l'epítot TAP a la part C-terminal de la proteïna E47 humana.

CAPÍTOL I – RESULTATS

Es van recollir els extrems cel·lulars que expressaven les construccions citades i es van purificar les proteïnes unides al complex de l'E47 per immunoprecipitació per purificació en tàndem (TAP, *Tandem affinity Purification*). Posteriorment es van analitzar els complexos purificats per nano-cromatografia líquida associada a ionització per nano-electrosprai i espectrometria de masses en tàndem (*nanoLC-electrosprayMS/MS*). Una vegada descartades les proteïnes que s'unien de forma inespecífica al control, vam identificar 5 proteïnes específiques:

Cèl·lules proliferant:	
N-terminal	MLK2 (<i>Mixed lineage Kinase 2</i>)
C-terminal	L31 (proteïna ribosomal) SorCS2 (<i>sortilin-related VPS10 domain containing receptor 2</i>)
Cèl·lules diferenciades:	
N-terminal	LRRN5 (<i>Leucine rich repeat neuronal 5 precursor</i>)
C-terminal	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase vitaminD-binding protein</i>

En les mostres en condicions de proliferació de la regió C-terminal d'E47 vam identificar dues proteïnes: la proteïna ribosomal L31, implicada en la correcció lectora del tRNA i el receptor de transmembrana SorCS2 (*sortilin-related VPS10 domain containing receptor 2*). Aquesta és una proteïna que pertany a la família de receptors que contenen el domini VPS10 (*vacuolar protein sorting 10*) i que juga un paper important en el transport de proteïnes i en la transducció de senyals (Hermey 2009). En canvi a les mostres que expressaven el TAP-N-terminal-E47 vam identificar la proteïna MLK2 (*Mixed lineage kinase 2*), també anomenada MST, MEKK10 o MAP3K10. La MLK2 és membre de la família de les serina/treonina quinases. Aquesta quinasa és activadora de la MAPK8/JNK i de la MKK4/SEK1, s'activa per autofosforilació o en ser fosforilada per les quinases de la via JNK, via en la que funciona de forma preferent. Està descrit que està involucrada en la mort neuronal per apoptosi per part del factor de creixement NGF (*Nerve Growth Factor*) al unir-se al receptor p75 (Davies, Tournier 2012, Kant *et al.* 2011, Katoh *et al.* 1995, Gallo, Johnson 2002, Bock *et al.* 2000b, Xu *et al.* 2001)

A les mostres del TAP-C-terminal-E47 en condicions de diferenciació vam identificar una proteïna d'unió a la vitamina D: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase vitaminD-binding protein*. Mentre que les que expressaven l'N-terminal vam identificar, el precursor de LRRN5 (*Leucine rich repeat neuronal 5 precursor*), una proteïna codificada per un gen que pertany a la superfamília de repetidors rics en leucines.

Ens vam interessar per MLK2 perquè estava descrit que la MLK2 interaccionava amb la NeuroD en cèl·lules neuronals N2A i afectava la seva activitat transcripcional (Marcora, 2003). La MLK2 també inhibeix la transcripció augmentant l'activitat corepressora del factor de transcripció Alien i de receptors nuclears (Eckey, 2003). Vam veure que la MLK2 era una proteïna molt interessant, ja que al tractar-se d'una quinasa quinasa quinasa capaç d'activar la via transduccional de la JNK (*c-Jun N-terminal Kinases*), desencadena apoptosi neuronal (Xu *et al.* 2001a). La MLK2 pertany a la família de les serina/treonina quinases, i actua com a MAP3quinases (*mitogen activated protein kinase kinase kinases*). Hi ha MLKs que s'expressen en tots els teixits, però la MLK2 és específica del cervell. Estructuralment la MLK2 té un domini SH3 (*Src homology 3 motif*), un domini catalític de les quinases, dues cremalleres de leucines i un domini d'interacció amb les Cdc42/Rac (*CRIB domain*) (**Figura 9A**) (Wang, Besirli & Johnson 2004).

8. La MLK2 interacciona amb l'E47

Vam confirmar la interacció entre l'E47 i la MLK2 per immunoprecipitació de proteïnes amb reïna α FLAG en cèl·lules HEK-293T transfectades amb l'E47 i diferents formes de la MLK2 fusionada a l'epítot FLAG: proteïna sencera, C-terminal (C-t) de l'aminoàcid 327 al 954, l'N-terminal (N-t) de l'aminoàcid 1 al 364 i la proteïna sense funció quinasa (KD), la qual tenia mutada la lisina 125 a alanina (Phelan *et al.* 2001).

Es va observar que la interacció era més forta amb la construcció de la MLK2 sencera i amb l' N-terminal (el qual inclou el motiu SH3 i el domini

CAPÍTOL I – RESULTATS

quinasa de la proteïna) que amb la part C-terminal. Donant suport a la hipòtesi que l'activitat quinasa té un paper clau en aquesta interacció, vam poder observar que amb el mutant sense activitat quinasa no hi havia co-immunoprecipitació de l'E47. La MLK2 necessita estar autofosforilada per ser completament activa (Zhao, Manser 2005); (Gallo, Johnson 2002), per tant aquest resultat ens suggereix que l'autofosforilació podria ser important per adquirir una conformació competent per interaccionar amb l'E47. A més a més, amb la sobreexpressió de la MLK2 vam observar per *Western blot* una disminució en la mobilitat de l'E47 (**Figura 9B**).

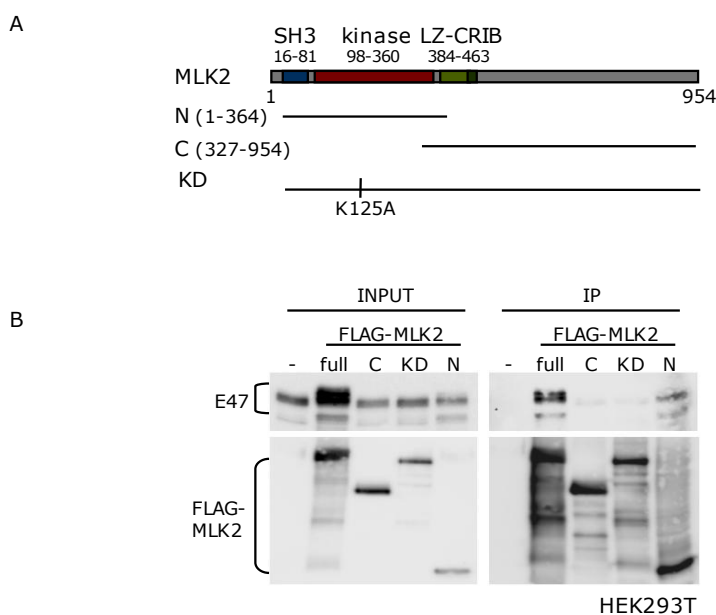


Figura 9. Interacció de la MLK2 amb l'E47 *in vivo*. (A) Esquema dels diferents dominis de la MLK2 humana mostrant un domini SH3 (Src homology 3 motif) a l'inici del domini N-terminal (1-364aa) i seguit d'un domini quinasa. Al C-terminal (327-954aa) presenta una cremallera de leucina (LZ) i un domini d'interacció amb Cdc 42/Rac (CRIB). (B) Es van transfectar cèl·lules HEK293T amb l'E47 i diferents fragments del FLAG-MLK2: sencera (full), C-terminal (C), mutant sense activitat quinasa (Kinase Dead, KD) i N-terminal (N) o FLAG-pcDNA3 com a control negatiu. Es va immunoprecipitar la MLK2 amb reïna d'agarosa M2α-FLAG. La interacció de l'E47 amb la MLK2 a les mostres de l'extret total (INPUT) i de la IP es van analitzar per *Western blot* amb els anticòs (ab) α-E47 i α-FLAG.

Vam voler saber si la NeuroD podria estar intervenint en la interacció E47-MLK2 ja que la MLK2 interacciona i activa la NeuroD (Marcora, Gowan &

Lee 2003). Com ja hem mencionat anteriorment, la NeuroD és un factor de transcripció bHLH que heterodimeritza amb l'E47 sobre les caixes *E-box* dels promotors de determinats gens diana (Massari, Murre 2000). A més, és necessari pel desenvolupament i supervivència d'un subconjunt de neurones i de cèl·lules endocrino-pancreàtiques (Dufton *et al.* 2005).

Vam dur a terme una co-immunoprecipitació de proteïnes amb reïna α -FLAG sobreexpressant de manera combinada la NeuroD, l'E47 i la MLK2 marcada amb l'epítot FLAG (FLAG-MLK2) en cèl·lules HEK293T (**Figura 10**). Vam veure un descens en la quantitat de proteïna co-immunoprecipitada amb la MLK2: l'E47 o la NeuroD (d'un 61% en el primer cas i d'un 72% en el segon) quan també estava co-immunoprecipitada la seva bHLH companya (la NeuroD i l'E47 respectivament), en comparació a quan només en co-immunoprecipitàvem una d'elles. Aquest resultat ens suggeria que la NeuroD no estava mediant una interacció indirecta MLK2-E47, sinó que més aviat competia per la quinasa, indicant que la interacció E47-MLK2. A més a més, la MLK2 necessita el domini LZ per interaccionar amb la NeuroD (Marcora, Gowan & Lee 2003), mentre que nosaltres vam veure que no era necessari per la interacció amb l'E47 (**Figura 9B**).

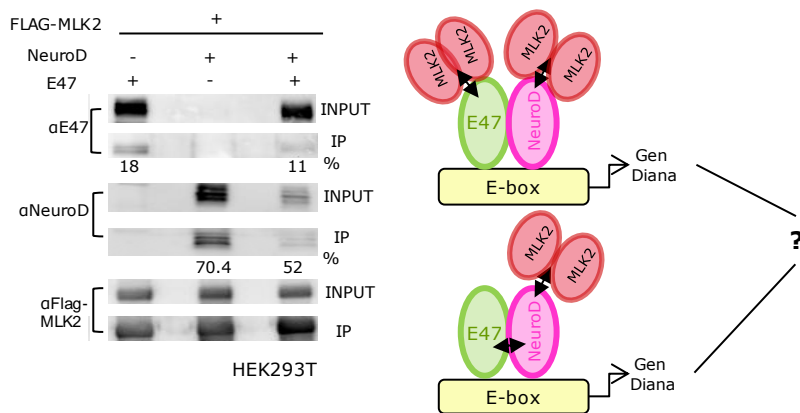


Figura 10. Interacció de l'E47 i la NeuroD amb la MLK2 *in vivo*. Es va cotransfectar la FLAG-MLK2 amb l'E47, la NeuroD o l'E47 juntament amb la NeuroD en cèl·lules HEK293T. Als extrems cel·lulars es va immunoprecipitar la MLK2 amb reïna α -FLAG i es va analitzar per *Western blot* amb l'anticòs α -E47 i α -NeuroD. Es mostra la proteïna immunoprecipitada quantificada respecte el seu INPUT.

9. L'E47 és fosforilat en presència de la MLK2 *in vivo*

Com hem dit anteriorment, la interacció MLK2-E47 produeix un canvi de mobilitat a la proteïna E47 (**Figura 9B**), també present quan la interacció amb l'E47 és només amb la part N-terminal de la proteïna MLK2, però en canvi no es veia en el mutant de MLK2 sense activitat quinasa. Com que està descrit que la MLK2 és constitutivament activa quan se sobreexpressa (Hirai *et al.* 1997), aquest canvi de mobilitat ens va fer pensar que podia ser degut a una fosforilació de l'E47 per part de la MLK2. Per comprovar si el canvi de mobilitat corresponia a una fosforilació vam dur a terme una anàlisi per *Western blot* amb un anticòs contra l'E47 de cèl·lules HEK293T transfectades solament amb l'E47 o amb l'E47 i la MLK2; vam tractar els extractes cel·lulars amb dues fosfatases diferents i/o inhibidors de fosfatases (**Figura 11**). Quan vam tractar les cèl·lules amb fosfatasa λ o amb SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) aquest increment de pes molecular desapareixia, indicant que el canvi de mobilitat era degut a la fosforilació per part de la MLK2.

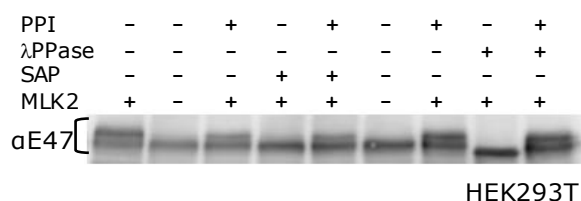


Figura 11. L'activació de la via MLK2 provoca la fosforilació de l'E47 *in vivo*. Extrets de cèl·lules HEK293T transfectades amb l'E47 i la MLK2 es van tractar amb fosfatasa λ (λ PPase) o fosfatasa alcalina Shrimp (SAP) i/o inhibidors de fosfatases (PPI). La fosforilació de l'E47 es detecta pel seu canvi de mobilitat en l'anàlisi per *Western blot* amb l'anticòs (ab) α -E47.

Vam observar també aquesta fosforilació en cèl·lules SH-SY5Y tant en proliferació com diferenciades amb RA (àcid retinoic), on, en ambdós casos, vam veure el canvi de mobilitat quan les cèl·lules estaven transfectades amb la MLK2 però no quan utilitzàvem el mutant sense activitat quinasa (**Figura 12**).

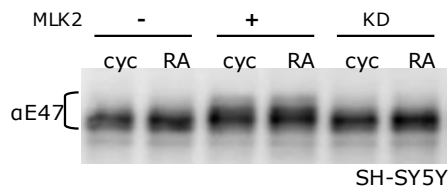


Figura 12. Fosforilació de l'E47 *in vivo* en cèl·lules SH-SY5Y. En cèl·lules SH-SY5Y en proliferació o diferenciades durant 5 dies amb àcid *retinoic* (RA) es va transfectar la MLK2 o el seu mutant sense activitat quinasa (KD) i es van analitzar els seus extrems per *Western blot* amb l'anticòs α-E47.

Es va comprovar en cèl·lules HEK293T que la part N-terminal és suficient per fosforilar l'E47 i que la MLK2 no pot fosforilar l'E47 a través de la seva part C-terminal (**Figura 12**). La part de la MLK2 que millor interacciona amb la E47 és la N-terminal (N-t), precisament on es troba la part catalítica de la proteïna. Aquest resultat està d'acord amb la **Figura 9** on es mostra que la part C-terminal no interacciona amb l'E47. Inicialment es va comprovar que amb la part N-terminal de l'aminoàcid 1 al 757 seguïem veient el canvi de mobilitat. Vam provar també amb la proteïna truncada fins a l'aminoàcid 496, el qual va continuar mostrant el canvi de mobilitat a l'E47.

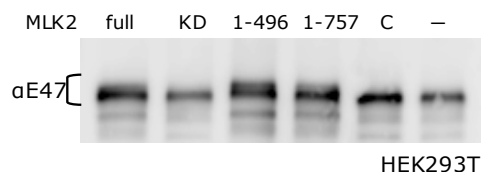


Figura 13. Fosforilació de l'E47 per diferents formes truncades de la MLK2. En cèl·lules HEK293T es va transfectar l'E47 i diferents construccions de la MLK2: sencera (*full*), sense activitat quinasa (KD), N-terminal (1-496aa) o 1-757, C-terminal (C, 327-954). El canvi en la mobilitat es va analitzar per *Western blot* amb un anticòs α-E47.

Vam voler comprovar si l'inhibidor específic de les MLKs CEP11004 afectaven a la fosforilació de l'E47 mostrant així l'especificitat de la quinasa MLK2 pel substrat E47. Vam comprovar per *Western blot* amb l'anticòs α-E47 que, a l'afegir l'inhibidor CEP11004 en cèl·lules HEK293T transfectades amb la MLK2 i l'E47 durant 24 hores, ens desapareixia la fosforilació (**Figura 13**).

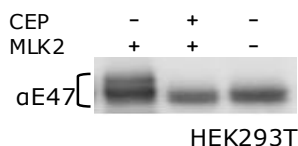


Figura 14. Efecte de l'inhibidor CEP11004 en la fosforilació de l'E47. Es va analitzar el canvi de mobilitat per *Western blot* amb l'anticòs α -E47 en cèl·lules HEK293T transfectades amb l'E47 i la MLK2 i tractades amb 400nM de l'inhibidor de la MLK, CEP11004, durant 24h.

10. L'E47 és fosforilada en presència de la MLK2 al domini d'activació AD2

El nostre següent objectiu va ser delimitar la regió fosforilada de l'E47 per la MLK2. L'E47 és una proteïna que presenta dos dominis d'activació, un a la part N-terminal i l'altre a la part més central d'aquesta. Dins del segon domini (AD2) trobem una seqüència descrita com a motiu LH (Quong *et al.* 1993), el qual va des de l'aminoàcid 345 al 408. A la part més C-terminal de la proteïna trobem el domini bHLH.

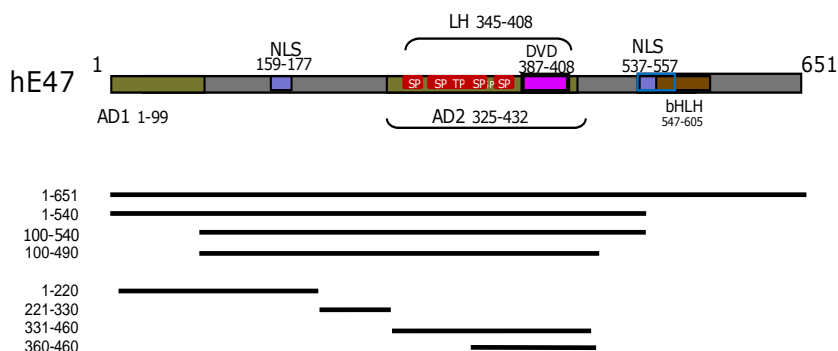


Figura 15. Construccions de l'E47 per localitzar els residus fosforilables amb la MLK2. Esquema dels diferents dominis de l'E47 humana fusionada a l'epítot TAP on l'AD1 i l'AD2 són dominis d'activació de la proteïna, els dos NLS (*Nuclear Localization Signal*) són motius de localització nuclear i el bHLH és el motiu *basic Helix Loop Helix*. L'AD2 conté el motiu *Loop Helix* (LH) el qual inclou un possible *docking site* (DVD) per a la MLK2. Per delimitar la regió de fosforilació en presència de la MLK2 es van utilitzar construccions amb deleccions seriades. En vermell veiem els residus de serina (S) o treonina (T) seguits de prolina mutats al domini d'activació AD2.

Amb 6 construccions de la proteïna E47 truncada fusionada a l'epítot TAP (**Figura 15**), vam acotar la zona fosforilada quan la MLK2 estava

sobreexpressada, observant el canvi de mobilitat per *Western blot* amb l'anticòs α -PAP el qual reconeix l'epítip TAP. Com mostra la **Figura 16** la fosforilació pràcticament no s'observava en els primers 330 aa (fragments 1-220 i 221-330), però es veia un canvi de mobilitat en presència de la MLK2 al fragment 331-460. Aquesta regió es correspon al domini d'activació AD2, que inclou el motiu LH.

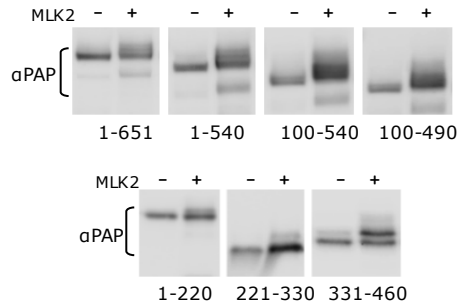


Figura 16. Localització de la regió d'E47 fosforilada en presència de la MLK2 *in vivo*. Es van transfectar diverses construccions de l'E47 fusionades a l'epítip TAP en cèl·lules HEK293T (veure materials i mètodes) en presència o absència de MLK2 per cotransfecció i es va analitzar el canvi de mobilitat de l'E47 per *Western blot* amb l'anticòs (ab) α -PAP.

S'ha descrit que la MLK2 reconeix una seqüència consens de 24aa present a les quinases de la via de les MAPK fosforilables per la MLK2 (Takekawa, Tatebayashi & Saito 2005). Vam comprovar que l'E47 tenia una homologia significativa amb aquest possible *docking site* en la regió que havíem identificat com a altament fosforilable en presència de la MLK2 (387-408aa) (**Figura 17**). Buscant serines i treonines properes al possible *docking site* conservades en diferents espècies en la regió 330-460aa, vam trobar-ne 5 seguides d'una prolina: la S-341, la S-352, la T-355, la S-359 i la S-379.

observat a la proteïna E47 en presència de la MLK2 desapareixia (**Figura 18B**).

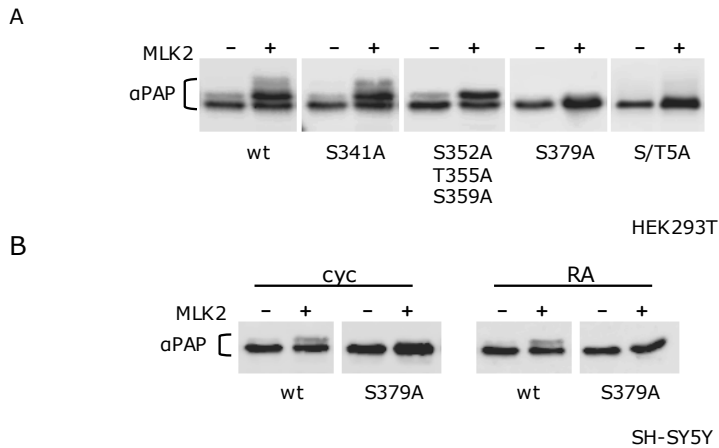


Figura 18. Efectes de les mutacions puntuals dels aminoàcids serina o treonina a alanina en la fosforilació de l'E47 en presència de la MLK2. A-B. La construcció de l'E47 331-460 Wt (wt) i amb diferents mutacions puntuals es va transfectar en cèl·lules HEK293T (A) i SH-SY5Y (B), tant en condicions proliferants (cyc) com diferenciades amb àcid retinoic (RA), i es va analitzar la mobilitat de l'E47 per *Western blot* amb l'anticòs α-PAP.

Per comprovar que la fosforilació era independent de la via JNK es va utilitzar l'inhibidor de JNK SP600125 (SP). Tal com es mostra a la

Figura **19A**, l'E47 continuava fosforilat en presència de l'inhibidor. Per comprovar el bon funcionament de l'inhibidor de la via JNK, vam seguir la fosforilació del substrat de JNK, c-Jun amb un anticòs contra c-Jun. Com que aquest punt era important per poder afirmar que els efectes sobre E47 eren deguts directament a la interacció amb la MLK2 i no per activació de la via JNK, vam abordar aquesta hipòtesi de diferents maneres. En cèl·lules primàries MEFs es van co-transfectar el fragment de l'E47 corresponent als aminoàcids del 331 al 460, la MLK2 i un dominant negatiu de la JNK (dnJNK)

Figura **19B**). Amb un anticòs contra la serina fosforilada 63 de la c-Jun vam comprovar que la c-Jun no estava fosforilada en presència del dominant negatiu de JNK, però en canvi amb l'anticòs contra PAP (per detectar els fragments de l'E47) seguíem veient el canvi de mobilitat del fragment. En darrer lloc, vam utilitzar MEFs deficients en JNK 1 i 2 (JNK^{-/-}) (

CAPÍTOL I – RESULTATS

Figura **19C)** en els quals seguïem veient la fosforilació de l'E47 en presència de la MLK2.

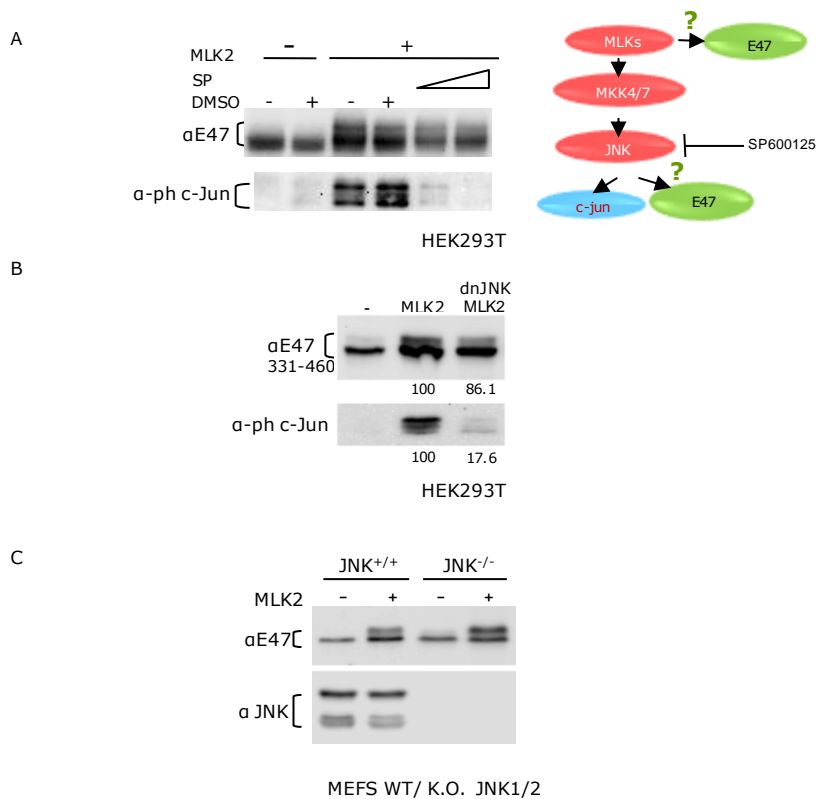


Figura 19. La inhibició de la via JNK no evita la fosforilació de l'E47 en presència de la MLK2 *in vivo*. (A) Es van transfectar cèl·lules HEK293T amb l'E47 i la MLK2, i es van tractar amb l'inhibidor de la JNK SP600125 en dosis creixents (18,2 μ M; 72,8 μ M) o amb DMSO com a control durant 24h. Les mostres es van analitzar per *Western blot* amb l'anticòs α -PAP. També es van analitzar amb l'anticòs α -ph-c-Jun (c-Jun fosforilat a la S63) per mostrar l'activitat de la via JNK.(B) Es van transfectar cèl·lules HEK293T amb el fragment 331-460aa de l'E47-TAP, la MLK2 i un dominant negatiu de la JNK (dnJNK) per estudiar la fosforilació de l'E47 (anticòs α -PAP) com un canvi en la mobilitat per *Western blot*. La fosforilació de la S63 de la c-Jun (anticòs α -ph-c-Jun) es mostra com a control d'activitat per part de la JNK. El percentatge de fosforilació es mostra com a valor relatiu sota les bandes. (C) Cèl·lules primàries MEFS (+/+) i deficientes en les JNK1 i 2 (JNK^{-/-}) es van transfectar amb el fragments 330-460aa d'e l'E47 i la MLK2 o el vector control FLAG-pcDNA3 i es va analitzar la seva fosforilació com a canvi de mobilitat mitjançant *Western blot* α -PAP o α -JNK com a control d'expressió de les JNK1 i 2.

11. La MLK2 fosforila a l'E47 *in vitro*

Per comprovar si la quinasa MLK2 fosforila directament a l'E47 *in vitro* vam fer assaigs quinasa. Es va purificar el domini N-terminal de la MLK2 (wt) i el mutant sense activitat quinasa (KD), i dos fragments de l'E47: un que conté tota la regió 331-460aa que inclou les cinc serines/treonines descrites anteriorment (E47 tp1) i un fragment més petit E47 tp2 (360-460aa), el qual només conté la S379, tots dos fragments, tp1 i tp2 sense mutar (wt) o amb les S/T mutades a alanina. Les construccions estaven fusionades a GST, de manera que es van generar les proteïnes a través de vectors d'expressió bacterians en *E.Coli* BL21. Tal com veiem a la **Figura 20A**, es va comprovar la seva concentració, mida i puresa en gels d'acrilamida tenyits amb blau de comassie.

A la **Figura 20B** podem veure que el fragment E47 tp1 Wt és fosforilat *in vitro* per MLK2 wt i no pel mutant MLK2 KD. Quan utilitzem el fragment petit E47tp2 amb la serina 379 mutada, la fosforilació ens desapareix, indicant que aquesta serina és fosforilada per MLK2. Però en el cas del fragment més gran E47 tp1 amb la serina 379 mutada a alanina, continuem veient fosforilació, per tant en aquest fragment tenim altres S/T que es poden fosforilar *in vitro*. Aquest fet el comprovem amb el mutant E47 tp1 amb les 5 serines/treonines mutades, la fosforilació desapareix pràcticament del tot. La conclusió d'aquests experiments és que els aminoàcids serina treonina localitzats dins el motiu LH al fragment comprés entre els aminoàcids 331-460 de l'E47 són fosforilats directament per MLK2 *in vitro*.

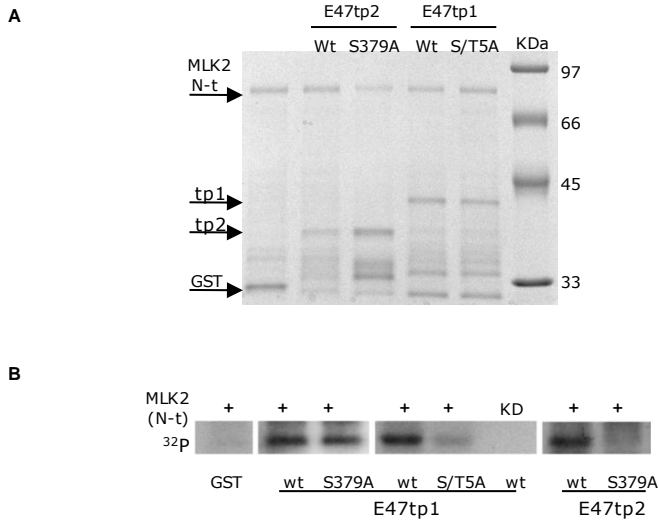
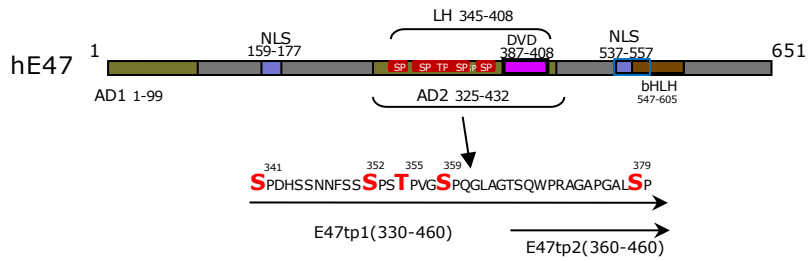


Figura 20. La MLK2 fosforila l'E47 *in vitro* al motiu LH. (A) Gel d'acrilamida tenyit amb blau de coomassie on es van carregar quantitats equivalents de proteïnes recombinats de GST (26kDa), E47tp1 wt i amb les S i T a alanina(43kDa), E47 tp2 wt i amb la S379 mutada a alanina (39kDa), i MLK2-Nt (1-496aa; 90kDa). (B) Els fragments proteics E47tp1(331-460aa) i E47tp2 (360-460aa) i els mutants puntuals S379A o ST5A d'aquestes regions fusionats amb GST es van purificar en vectors d'expressió bacterians en *Escherichia coli* BL21 *in vitro*. Es van fer assaigs quinasa *in vitro* amb la proteïna recombinant N-t de la MLK2 (1-496aa) i el fosfo-ATP marcat radioactivament (32 PyATP). Es mostra l'autoradiografia corresponent.

12. La MLK2 inhibeix l'activitat transcripcional de l'E47 sobre el promotor del TrkB

Vam estudiar els efectes de MLK2 sobre l'activitat transcripcional d'E47. Per estudiar aquest efecte vam utilitzar dos promotors de dos gens que ja s'havien descrit al nostre laboratori que eren activats per l'E47: el TrkB (receptor de la neurotrofina BDNF) i el p21 (inhibidor del cicle cel·lular) (Liu *et al.* 2004). Es van fer assaigs luciferasa en cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb l'E47 o co-transfectades amb la MLK2 (o el seu mutant sense activitat quinasa (KD) i el gen reporter luciferasa fusionat al promotor del TrkB o del p21. Tal i com estava descrit, vam observar un augment significatiu en l'activitat de tots dos promotors quan transfectàvem solament l'E47, tant en condicions proliferatives com de diferenciació amb àcid retinoic (RA) (Liu *et al.* 2004). I per altra banda, vam veure una inhibició significativa en l'activitat del promotor del TrkB quan se sobreexpressava la MLK2, que alhora era depenent de l'activitat quinasa, ja que amb el mutant sense activitat quinasa (KD) no podíem veure la mencionada inhibició. El fet que no reprimís l'activitat del promotor del p21 ens demostrava que era una acció específica i determinada de la MLK2 sobre el promotor del TrkB (**Figura 21**), suggerint que la MLK2 podria està implicada en el procés de diferenciació neuronal i/o supervivència però no en el control d'aturada de cicle.

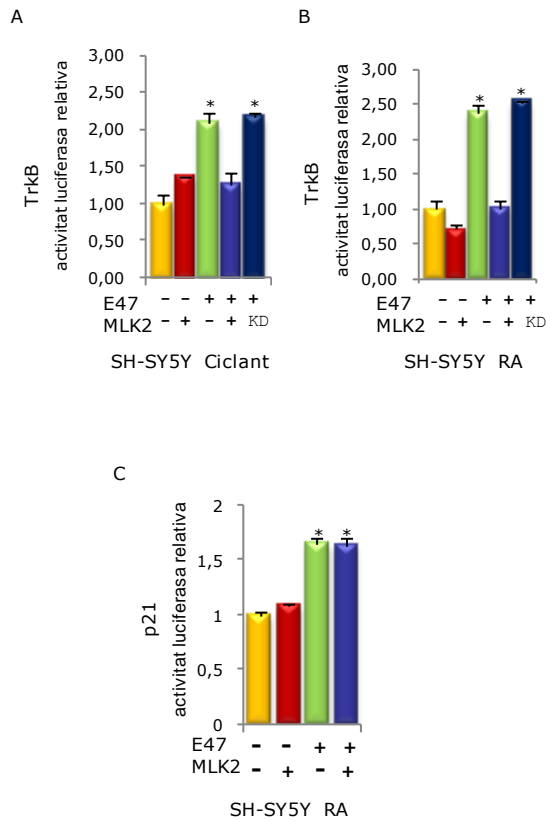


Figura 21. La MLK2 inhibeix la transactivació de l'E47 sobre el promotor del TrkB però no sobre el promotor del p21. Efectes de la MLK2 en l'activació del promotor del TrkB i el p21 a través de l'E47 en cèl·lules SH-SY5Y proliferants (A) i diferenciades durant 4-5 dies amb àcid retinoic (RA) (B)(C). Es van cotransfectar amb l'E47, la MLK2 (o el mutant MLK2 sense activitat quinasa, KD) i la construcció Promotor TrkB fusionat al GenReporter luciferasa en (A)(B) o amb la del promotor p21 fusionat al GenReporter luciferasa en (C) a més de la construcció VectorReporter Renilla, i es van recollir un dia després de transfectar per determinar-ne l'activitat luciferasa relativa a l'activitat renilla. Es mostren les mitjanes i els errors estàndards de tres experiments independents en A i B, i de 2 en C. Les diferències significatives ($\alpha=0.05$) respecte el control s'indiquen amb un *.

13. La repressió transcripcional sobre el promotor del TrkB per la MLK2 necessita els residus S/T identificats al motiu LH de l'E47.

A continuació ens vam centrar en estudiar la rellevància fisiològica de les fosforilacions de l'E47 per la MLK2. Volíem saber si la fosforilació per la MLK2 regulava la seva activitat transcripcional sobre el promotor del trkB. Per abordar el nostre objectiu vam repetir els assaigs luciferasa descrits a la **Figura 21**, però en aquest cas utilitzant també les mutacions puntuals de l'E47 de la regió identificada. El que vam observar va ser que podíem revertir els efectes d'inhibició de la MLK2 sobre el promotor del trkB quan teníem les cinc serines/treonines de la regió tp1 mutades a alanina (S341A, S352A, T355A, S359A i S379A) (**Figura 22A**). Aquest resultat ens indicava que la repressió del TrkB a través de la MLK2 requeria els 5 residus S/T de l'E47 que es fosforilen tant *in vivo* com *in vitro*, confirmant la importància dels cinc residus per a l'activitat transcripcional de l'E47 sobre el promotor del trkB.

Per estudiar la rellevància funcional de la MLK2 sobre l'E47, vam determinar els nivells d'expressió endògens de TrkB, vam cultivar cèl·lules SH-SY5Y diferenciades amb àcid retinoic en presència o absència de l'inhibidor de MLKs CEP11004. Vam observar un increment de l'mRNA endogen del trkB en presència de CEP11004 corroborant els experiments mostrats anteriorment amb els reporters luciferasa. L'expressió de TrkB es va determinar a través de PCR quantitativa (**Figura 22B**).

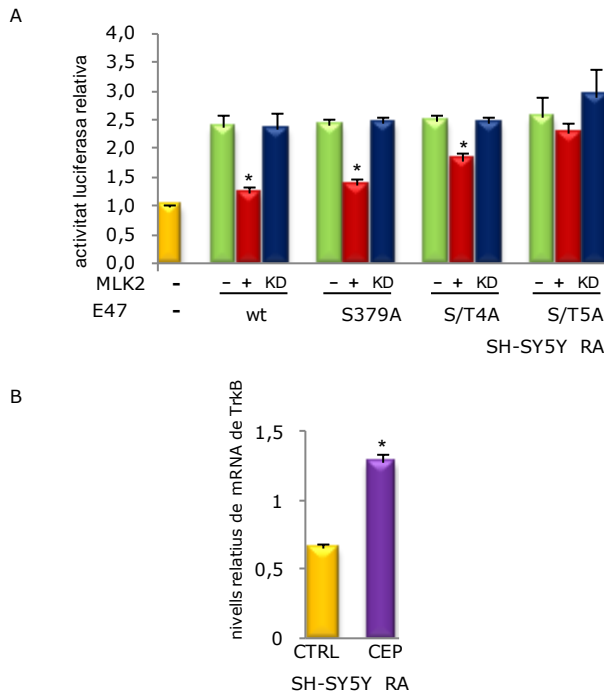


Figura 22. La repressió transcripcional sobre el promotor del TrkB per la MLK2 necessita els residus S/T identificats al motiu LH de l'E47. (A) Es van diferenciar cèl·lules SH-SY5Y amb àcid retinoic (RA) durant 3-4 dies i es van transfectar amb les construccions següents: el promotor TrkB fusionat al GenReporter luciferasa, l'E47 (Wt) o l'E47 amb les mutacions puntuals als residus S/T identificats al motiu LH i/o la MLK2, el mutant d'aquest sense activitat quinasa (KD) o el vector buit com a control a més del VectorReporter Renilla. Es van recollir al cap de 24h per determinar les activitats luciferasa relatives a l'activitat Renilla. El quàdruple mutant S/T4A es refereix a les mutacions S352A,T355A,S359A, S379A. El quintet S/T5A inclou les mateixes mutacions citades a més de la S341. Observem les mitjanes i els errors estàndards de cinc experiments independents. Les diferències significatives ($\alpha=0.05$) respecte l'E47 Wt estan indicades amb un *. (B) Es van tractar cèl·lules SH-SY5Y diferenciades amb RA amb 400nM de l'inhibidor CEP11004 durant 24h (o cèl·lules control sense tractar) i es van recollir per extreure'n l'RNA. Es va fer una anàlisi PCR quantitativa pel gen trkB relatiu al TFRC com a control. Es mostren la mitjana i els errors estàndards de tres experiments independents. Les diferències significatives ($\alpha=0.05$) respecte el control estan indicades amb un *.

Per últim vam voler comprovar si els resultats demostrats en la línia cel·lular SHSY-5Y, els podíem repetir i confirmar en un cultiu primari neuronal concretament en neurones granulars de cerebel de rata. Com es veu a la **Figura 23A**, el CEP11004 augmentava significativament l'activitat del promotor de trkB tant si sobreexpressàvem MLK2 com si no. Obteníem el mateix resultat si transfectàvem les cèl·lules amb el mutant de MLK2 sense activitat quinasa (KD), indicant que aquest mutant es comporta com un dominant negatiu.

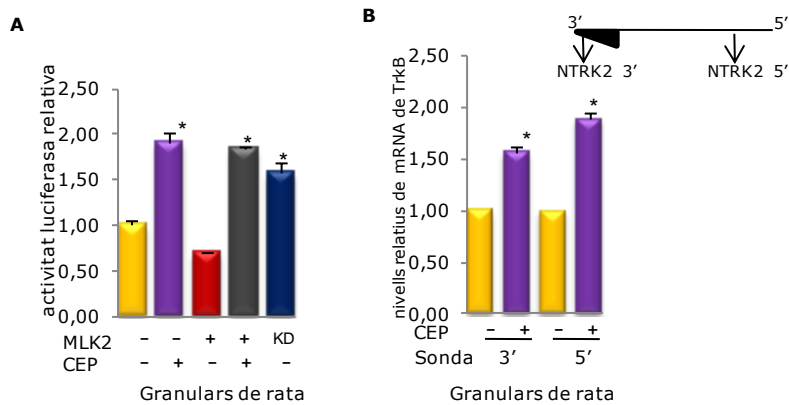


Figura 23. La MLK2 inhibeix l'expressió del TrkB en neurones granulars de cerebel de rata. (A) Es van transfectar neurones granulars de cerebel de 6 DIVS amb la construcció Promotor TrkB fusionat al GenReporter luciferasa i la MLK2 (Wt) o el seu mutant sense activitat quinasa (KD) a més del Vector *Reporter* Renilla. Posteriorment es van tractar les cèl·lules, amb 400nM de l'inhibidor CEP11004, excepte les cèl·lules control, durant 18h per determinar-ne l'activitat luciferasa relativa a l'activitat renilla. Es mostren les mitjanes i els errors estàndards de sis transfeccions independents. Les diferències significatives ($\alpha=0.05$) respecte el control es mostren amb un *. (B) En neurones granulars de cerebel de rata tractades o no amb 400nM de CEP11004 durant 24h es va extreure l'RNA i es va fer una anàlisi PCR quantitativa amb dues sondes diferents, una per l'extrem 3' i una altra pel 5' de l'mRNA del TrkB relativitzades a GAPDH com a control. Es mostra la mitjana i els errors estàndards de sis experiments independents. Les diferències significatives ($\alpha=0.05$) respecte el control estan indicades amb un *.

Finalment vam quantificar els nivells d'expressió endògens de *trkB* amb dues sondes de diferents regions del seu mRNA en cèl·lules granulars tractades amb o sense l'inhibidor CEP11004. Tant amb una sonda com amb l'altra vam obtenir un increment significatiu dels nivells relatius de l'mRNA de *trkB* quan tractàvem el cultiu amb l'inhibidor CEP11004 (**Figura 23B**).

DISCUSSIÓ

L'activitat de la quinasa MLK2 està involucrada en la regulació de la via apoptòtica JNK (Handley *et al.* 2007, Gallo, Johnson 2002). En aquest capítol mostrem que la MLK2 reprimeix l'activitat del promotor del TrkB fosforilant l'E47 de manera independent de l'activitat del JNK.

Se sap que l'E47 s'uneix a les seqüències de les caixes E al promotor del TrkB i activa la seva transcripció, i en conseqüència la via de supervivència (Liu *et al.* 2004).

14. La MLK2 fosforila l'E47 inhibint la seva activitat transcripcional

El mecanisme molecular que modula l'activitat transcripcional de l'E47 no està completament entès, però s'ha demostrat que el seu estat de fosforilació és important per aquesta modulació.

La fosforilació de l'E47 a les serines 514 i 529 dins de la regió bHLH pot determinar la seva activitat transcripcional. Quan el complex homodímer E47-E47 té fosforilades ambdues proteïnes perd la capacitat d'unir-se al DNA, mentre que si només ho està una d'elles encara pot unir-s'hi (Sloan *et al.* 1996). També s'ha demostrat que la fosforilació de l'E47 en la serina 140 per la quinasa p38 és bàsica per a la formació del complex heterodimèric E47-MyoD i la subseqüent unió a les caixes *E-box* als promotors dels gens miogènics per activar-ne la seva transcripció (Lluis *et al.* 2005). D'altra banda, alguns experiments demostren com la MAPK p38 fosforila l'E47 en una regió de l' N-terminal (el qual no inclou el motiu bHLH) i inhibeix la seva activitat sobre la miogènesi sense que la unió del complex al DNA es vegi afectada (Page *et al.* 2004).

En aquesta Tesi doctoral hem demostrat que la MLK2 fosforila l'E47 en 5 residus serina/treonina presents al domini d'activació AD2 i que són importants per l'activitat transcripcional d'E47.

Inicialment, als nostres experiments vam identificar la proteïna MLK2 com una proteïna que interacciona amb l'E47 en la construcció TAP-E47 N-terminal. Tot i això, als nostres experiments la fosforilació de l'E47 per la MLK2 no es produeix a la part amino- de la proteïna (com fins al moment han

CAPÍTOL I - DISCUSSIÓ

estat descrites les altres fosforilacions per altres quinases), sinó a la part C-terminal, concretament dins del domini d'activació AD2, a la regió identificada com LH (*Loop helix*). Aquesta regió és capaç de formar una estructura en forma de *loop* entre els aminoàcids 345 i 394, a més d'una α -hèlix entre els aminoàcids 395 i 408 (Quong *et al.* 1993, Aronheim *et al.* 1993) i mostra diferents propietats transactivadores depenent del tipus cel·lular utilitzat, suggerint que aquesta regió podria estar regulada per co-activadors o co-repressors específics de llinatge cel·lular (Aronheim *et al.* 1993). Per exemple, la c-Jun ha estat descrita com una inhibidora del potencial transactivador de l'E47 actuant al domini AD2 de l'E47 (Robinson *et al.* 1995). Se sap que la c-Jun reprimeix l'E47 a través de la seva cremallera de leucines (LZ), però no es coneix exactament el mecanisme utilitzat. De totes maneres se sap que la c-Jun, quan actua com un trans-repressor, no té la mateixa conformació que quan aquesta proteïna està fosforilada per la JNK i activa gens apoptòtics. La JNK és una MAPK que fosforila la c-Jun a les serines 63 i 73 per a la seva transactivació i funcions oncogèniques (Smeal *et al.* 1991) però s'ha demostrat que aquestes serines no són les responsables de la inhibició mostrada a l'E47 (Robinson *et al.* 1995). L'activació de la c-Jun per part de la JNK, no és la via per la qual la c-Jun inhibeix l'E47 a les cèl·lules pancreàtiques tipus alfa i beta. El factor de transcripció ATF2 forma heterodímers amb la proteïna c-Jun per activar el promotor del gen c-Jun, independentment de si les serines 63 i 73 de la c-Jun estan o no fosforilades per la JNK (van Dam *et al.* 1995). Aquest fet el converteix en un bon candidat per a l'activació de la c-Jun, excloent la possibilitat que l'efecte de la MLK2 a l'activitat de l'E47 sigui a través de proteïnes activades per sota de la via JNK. Els nostres resultats, a més, mostren que la trans-repressió de l'E47 deguda a la seva fosforilació en presència de la MLK2, és clarament independent de la JNK. Ho hem confirmat tant amb inhibidors de JNK (on la presència de la c-Jun fosforilada és molt minsas), com amb un dominant negatiu de JNK i amb cèl·lules primàries de ratolí al qual li manca l'expressió de JNK 1 i 2.

La MLK2 s'expressa sobretot al cervell i està descrit que es pot localitzar tant al nucli com al citoplasma, tot i que al nucli s'ha vist només en cèl·lules germinals (igual que la proteïna associada a microtúbuls MAP2, la qual és citoplasmàtica en neurones però és nuclear a les cèl·lules germinals

dels testicles de rata) (Phelan *et al.* 1999, Eckey *et al.* 2003, Phelan *et al.* 2001).

La MLK2, a part d'estar implicada en la via apoptòtica de la JNK, és capaç de fosforilar directament factors de transcripció com la bHLH companya de l'E47, la NeuroD i el co-repressor Alien. La MLK2 necessita dimeritzar per ser funcional (Leung, Lassam 1998). Aquesta dimerització la fa a través del seu motiu cremallera de leucines (LZ), cosa que també li serveix per interaccionar amb algunes proteïnes com la NeuroD (Marcora, Gowan & Lee 2003), mentre que l'E47 en pot prescindir, tal com mostrem als nostres resultats, on veiem una bona interacció i fosforilació entre l'E47 Wt i la part N-terminal de la MLK2, a la qual li manca el motiu LZ.

Fins al moment, la fosforilació de la NeuroD per MLK2 ha estat descrita en embrions de *Xenopus*, on amb l'ajuda de les proteïnes *scaffold* Htt (Huntingina) i HAP1 (*Huntingtin Associated protein1*) faciliten l'activació de la NeuroD (Marcora, Gowan & Lee 2003). La MLK2 ha estat descrita com una MAP3K activadora de vies com la JNK i la p38 (Handley *et al.* 2007, Wang, Besirli & Johnson 2004, Hirai *et al.* 1997, Gallo, Johnson 2002), però també s'ha vist involucrada en la fosforilació d'altres substrats aliens a aquestes vies. Excepte en la NeuroD, on la seva fosforilació resulta positiva per l'activació d'aquesta proteïna, la MLK2 ha estat descrita com una proteïna inhibidora de les vies de supervivència i diferenciació. Així, per exemple, l'Alien és un co-repressor nuclear la fosforilació del qual augmenta el seu poder repressor en gens implicats en la diferenciació neuronal (Eckey *et al.* 2003).

Que el resultat de la fosforilació per MLK2 en dos substrats que dimeritzen entre ells com són la NeuroD i l'E47, sigui antagònic pot veure's com desconcertant. De totes maneres, el fet que l'activitat de la NeuroD s'analitzés de forma indirecta en embrions de *Xenopus* on microinjectaven mRNA i mostraven neurogènesi ectòpica (Marcora, Gowan & Lee 2003) fa que les conseqüències directes a les propietats transactivadores de la NeuroD no estiguin demostrades. A més, segons (Moore, Schneider & Vetter 2002) hi ha diferències entre les seqüències de la NeuroD en diferents espècies, i en cada una, una fosforilació pot produir diferents efectes.

CAPÍTOL I - DISCUSSIÓ

S'ha demostrat que la NeuroD interacciona amb l'E47 (Naya, Stellrecht & Tsai 1995), que la MLK2 fosforila la NeuroD (Marcora, Gowan & Lee 2003) i també a l'E47, per això podríem hipotetitzar que la manca d'activació del promotor *trkB* pel complex E47/NeuroD en presència de la MLK2 es podria deure a la manca d'unió del complex a les caixes E del mencionat gen, o a la disrupció de l'heterodímer. Tot i que vam poder co-immunoprecipitar l'E47 i la NeuroD a través de la MLK2 indicant que les dues proteïnes es troben dins del mateix complex, vam co-immunoprecipitar menys quantitat de l'E47 o de la NeuroD quan totes dues estaven sobreexpressades a la mateixa extracció que en comparació quan només se'n sobreexpressava una, donant a entendre que l'E47 i la NeuroD competien per la unió amb la MLK2. Per tot això s'hauria de confirmar la formació del dímer NeuroD-E47 en presència de la MLK2, ja que es podria donar el cas de que l'E47 i la NeuroD s'unissin a la MLK2 de manera independent. És més, la interacció-fosforilació de la MLK2 amb l'E47 podria desestabilitzar el complex NeuroD-E47 i, conseqüentment, evitar l'activació dels seus gens diana com el *TrkB*.

La NeuroD i l'E47 són activadores tant del gen *trkB* com de l'inhibidor de cicle $p21^{cip}$, a través de la unió a les caixes E presents al promotor d'E47 (Liu *et al.* 2004). Tal i com mostrem als nostres resultats, mentre que la fosforilació de l'E47 per MLK2 inhibeix l'activació del *TrkB*, no passa el mateix amb el $p21^{cip}$, en el qual la seva expressió no es veu modificada per la presència de la MLK2. Aquest fet demostra que la MLK2 participa més en la via de diferenciació neuronal que no en la d'inhibició del cicle cel·lular. Possiblement el $p21^{cip}$ compti amb altres estratègies per expressar-se en el cas que el complex NeuroD-E47 fosforilat estigui inactiu. El promotor del $p21^{cip}$ presenta elements on s'uneixen receptors d'àcid retinoic amb la unió del qual comença la seva expressió (Liu *et al.* 2004) i, segurament, a diferència del *TrkB*, amb l'ajut d'altres co-repressors / co-activadors pot mantenir la seva expressió.

La MLK2 reconeix una seqüència consens de 24 aminoàcids en molts dels seus substrats (Takekawa, Tatebayashi & Saito 2005). Segons les nostres anàlisis, la seqüència de l'E47 presenta una alta homologia amb aquesta seqüència consens (*veure*

Figura 19 **Figura 17 dels resultats**) a la regió LH dins del domini d'activació AD2. Dins d'aquesta regió, trobem els aminoàcids S341, S352, T355, S359 i S379, els quals són fosforilats per la MLK2, produint conseqüentment una repressió transcripcional a l'E47 que es reflexa en una menor transcripció del TrkB. Aquesta fosforilació l'hem pogut demostrar *in vitro* amb assajos quinasa. Al analitzar la mobilitat de diferents construccions amb mutacions puntuals als residus potencialment fosforilables de l'E47 deguda a la quinasa MLK2, vam pensar que el residu més important per a aquesta fosforilació era la serina 379 (ja que la mobilitat de l'E47 desapareixia quan aquesta estava mutada). Però vam observar, a través d'assajos quinasa i mesurant l'activitat del promotor del TrkB amb assajos luciferasa, que tots cinc aminoàcids descrits anteriorment eren importants per a la repressió transcripcional del TrkB deguda a la MLK2.

15. La fosforilació de l'E47 per la MLK2 pot ser determinant pel destí cel·lular de neurones granulars del cerebel.

Els nostres resultats ens indiquen que la fosforilació de la proteïna E47 als residus serina/treonina dins del motiu LH al domini d'activació AD2 inhibeix l'E47 com a activador transcripcional del TrkB. Anteriorment ja s'havia descrit en neurones granulars post natalis de rata mancades de potassi i sèrum (components essencials per evitar una mort apoptòtica en aquest tipus cel·lular) l'augment dels nivells del TrkB (i del TrkA en neurones simpàtiques també privades de sèrum) quan s'impedeix l'activitat de la MLK2 amb el seu inhibidor CEP11004 (Wang, Paden & Johnson 2005). La CEP-11004 i la CEP-1347 són dues molècules descrites com inhibidores de les MLKs al sistema nerviós central i perifèric (Gallo, Johnson 2002). Amb la seva aplicació s'han observat propietats protectores de la mort apoptòtica neuronal inhibint la via JNK i de l'activació de la via de supervivència a llarg termini PI3-K/AKT a través de l'augment d'expressió dels receptors Trk (Wang, Paden & Johnson 2005).

Aquest doble efecte explicaria l'acció protectora dels inhibidors de les MLKs en models de malalties mentals i neurodegeneratives com per exemple

la malaltia d'Alzheimer, on en les neurones basals colinèrgiques del prosencèfal, l'expressió del TrkA es troba disminuït en rates velles (Boissiere *et al.* 1997). D'acord amb els resultats de (Wang, Paden & Johnson 2005), hem observat que la repressió de l'activitat quinasa MLK2 amb la molècula inhibidora de les MLKs CEP11004, augmenta l'expressió del mRNA de trkB i l'activitat del promotor trkB en neurones granulars del cerebel de rata i en cèl·lules de neuroblastoma SH-SY5Y en procés de diferenciació.

16. Efectes fisiològics en l'alteració de la via de supervivència TrkB/PI3K/AKT

La interacció del domini SH3 de la MLK2 i una zona rica en prolines de l'amino-terminal de la proteïna de Huntingtina reté la MLK2 i n'inhibeix la seva activitat. Segons (Liu, Dorow & Marshall 2000), a la malaltia de Huntington, la proteïna Huntingtina (Htt) no és capaç d'unir-se correctament a la MLK2, deixant-ne lliure més quantitat de la necessària i, per tant, activant la via de mort de la JNK (Liu, Dorow & Marshall 2000). Aquest fet, relacionat amb els descobriments realitzats per (Gines *et al.* 2006), els quals descriuen que els ratolins *Knock-in* amb Htt mutada (la qual imita la malaltia de Huntington) tenen els nivells del receptor TrkB reduïts, coincideix amb el nostre model, on l'excés de la MLK activada podria fosforilar l'E47 disminuint l'expressió del TrkB. Per tant, ens surgeix la pregunta de si un tractament, com per exemple amb els ja comentats inhibidors de les MLKs, els quals reforcen l'expressió del TrkB, podria ajudar a retardar l'evolució d'aquesta malaltia. De fet hi ha diversos autors que ho han estat provant amb models animals de Huntington i faltaria veure l'evolució al tractament de persones amb aquesta malaltia (Apostol *et al.* 2008, Conforti *et al.* 2008).

D'altra banda, aquesta molècula inhibidora de les MLKs, CEP-1347 així com la CEP11004, mostren resultats positius en cultius cel·lulars, entre d'altres en HAND (*HIV-1 Associated Neurocognitive Disease*) (Gelbard *et al.* 2010), però no semblen aportar diferències significatives en els assaigs clínics que s'han efectuat en malalties com la de Parkinson. Segons Wang, Johnson 2008, aquests resultats es podrien explicar, en part, per la ineficiència d'evitar la mort neuronal deguda a la manca de factors tròfics

com el de BDNF però no per la no inhibició de la via de les MLKs, on els inhibidors s'han mostrat eficients (Melo *et al.* 2011).

Aquests resultats suggereixen un nou mecanisme molecular on la MLK2 regula l'expressió del TrkB fosforilant l'E47; mostrant una relació molecular clara i directa entre les vies del JNK i el PI3-K, i explicaria els efectes causats pels inhibidors CEP de les MLKs als nivells dels receptors del TrkB i en supervivència.

Se sap que la supervivència neuronal depèn en gran mesura de la disponibilitat de factors de creixement. Una de les funcions clau d'aquests és inhibir la programació de mort cel·lular (Deshmukh, Johnson 1997). Segurament existeix un mecanisme que afegeix seguretat al sistema, convertint els sistemes de respostes lineals en 'interruptors'. Així, fins que no s'arriba a un cert grau de manca de factors tròfics no s'activa la via irreversible d'apoptosi. En la nostra hipòtesi, quan els senyals tròfics són alts, l'E47 asseguraria nivells alts del TrkB, i contribuiria de forma positiva a les vies de supervivència cel·lular. D'altra banda, quan hi ha una manca de factors tròfics augmentarien els nivells de la MLK activa a través de senyals apoptòtics, i per tant activant els efectes de la via de mort apoptòtica JNK, i paral·lelament reduint els nivells del TrkB dependents de l'E47, reduint els senyals de supervivència cel·lular. L'E47 serviria de pont d'unió entre les vies de mort i supervivència.

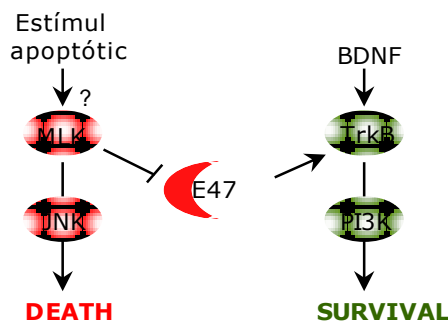


Figura 24. La inhibició de l'E47 per part de les MLKs podria coordinar les vies de mort i supervivència en neurones. Esquema mostrant la unió molecular establerta per l'E47 i les vies JNK i PI3K. Quan hi ha nivells tròfics alts, l'E47 proporciona nivells alts del receptor TrkB, activant la via de supervivència. Quan hi ha estímuls apoptòtics, les proteïnes MLKs actives van augmentant i, a través de la via JNK, porten la cèl·lula a la mort, alhora que limiten l'expressió del TrkB mediata per l'E47 evitant senyals cel·lulars de supervivència.

Implicació de la quinasa KIS en traducció neuronal localitzada

CAPÍTOL II

INTRODUCCIÓ

17. Traducció localitzada en neurones i plasticitat sinàptica

L'anatomia neuronal té una sèrie de dificultats per poder subministrar proteïnes de forma ràpida des del nucli a les zones més allunyades com les neurites. Subministrar proteïnes als axons i a les dendrites no és només un requisit per mantenir la massa i la viabilitat axoplàsmica en estat estacionari, sinó que també serveix per satisfer els requeriments de creixement associats a canvis dinàmics estructurals (Alvarez, Giuditta & Koenig 2000) com la plasticitat. Les neurones han solucionat aquest entrebanc transportant els mRNAs silenciats des del nucli fins al seu destí on seran traduïts. Entendre com es regulen la localització dels mRNAs i la seva traducció localitzada en axons i dendrites a nivell molecular ajuda a entendre alguns aspectes fonamentals de la plasticitat sinàptica i de la diferenciació neuronal (Sossin, Lacaille 2010, Sutton, Schuman 2006, Richter, Klann 2009)(Bramham, Wells 2007, Hengst *et al.* 2009, Hirokawa 2006, Zukin, Richter & Bagni 2009, Wang, Martin & Zukin 2010). S'entén per plasticitat sinàptica la modificació de llarga durada dels circuits neurals a través de la modificació de la transmissió sinàptica preexistent com a conseqüència d'un potencial d'acció. La plasticitat és l'habilitat de les neurones d'alterar la seva comunicació a través de les connexions sinàptiques en resposta a l'estimulació elèctrica o mediata per neurotrofines, i es considera la base de la memòria a llarg termini. Les dues formes més estudiades de plasticitat sinàptica són les LTP (*Long Term Potentiation*) i les LTD (*Long Term Depression*), les quals corresponen a increments o decrements de transmissió sinàptica (Richter 2010). La LTP es desglossa en fase inicial (*Early-LTP*) i fase tardana (*Late-LTP*). Només en la fase tardana, tal com en la formació de la memòria a llarg termini es necessita nova expressió gènica i recentment s'ha demostrat que també es requereix síntesi proteica *de novo* localitzada.

18. Regulació general de la traducció en eucariotes

La síntesi de proteïnes es divideix en tres passos:

La iniciació (on s'uneix un ribosoma competent per la traducció al codó d'inici d'un mRNA), l'elongació (on es van unint els aminoacil-tRNA per anar formant un polipèptid) i la terminació (on s'allibera la proteïna completada). Aquests passos es regulen per factors de traducció. Els que regulen la iniciació s'anomenen eIF (*eukaryotic initiation factor*), els de l'elongació eEF (*eukaryotic elongation factor*), i els de la terminació eRF (*eukaryotic release factor*).

La regulació d'aquests processos finalitza en una síntesi proteica diferencial i canvis profunds en la fisiologia de la cèl·lula. Així, per exemple, la regulació de la traducció pot estar controlant fenòmens tant diversos com l'aprenentatge i la formació de la memòria, el patró de formació durant el desenvolupament o el càncer.

18.1. Iniciació:

La iniciació de la traducció comença quan es forma un complex ternari format per una guanosina trifosfat (GTP), el Met-tRNA i el factor d'inici eIF2: eIF2·GTP·Met-tRNA. El complex ternari juntament amb els factors eIF5, eIF1, eIF1A i eIF3 s'associen amb la subunitat 40S del ribosoma formant la subunitat del complex de pre-inici 43S. La traducció es podria iniciar també de manera cap-independent, per exemple unint el complex 43S a un lloc intern d'entrada del ribosoma (IRES, *Internal Ribosomal Entry Site*), localitzat *upstream* del codó AUG (Kindler *et al.* 2005).

Paral·lelament, l'extrem 5' de l'm⁷G-mRNA (cap) és reconegut pel complex eIF4F (eIF4G, eIF4A, eIF4E), (**Figura 25**) a on s'uneix la subunitat 43S a través del factor eIF2 i amb l'ajuda del factor eIF3 formen la subunitat del complex de pre-inici 48S. El factor eIF4G té dominis d'unió a l'mRNA, a la PABP (*Polyadenylation Binding Protein*) i a l'eIF3. Aquestes interaccions serveixen per estabilitzar i recircular l'mRNA complexat amb l'eIF4F. D'aquesta manera l'eIF4G pot lligar el cap del 5' mRNA (via l'eIF4E) a la cua

poli(A), i augmentar l'eficiència de traducció a través del PABP (Derry *et al.* 2006). Més tard el complex 48S escaneja l'mRNA en direcció 3' fins que troba el codó d'inici AUG, al qual s'ha unit la subunitat ribosomal 60S. En aquest moment la subunitat ribosomal 60S s'uneix al complex ja dissociat dels factors proteics d'inici, formant el ribosoma competent per a la traducció 80S i amb l'ajuda del factor eIF5 comença l'elongació.

18.2. Elongació:

Els factors més importants en aquesta etapa són eEF1A, eEF1B i eEF2. Els eEF1A/B guien els aminoacil-tRNA cap al ribosoma i l'eEF2 catalitza la translocació de cada codó a l'mRNA. La fosforilació d'eEF1A/B per PKC augmenta la seva activitat, mentre que la fosforilació de l'eEF2 redueix la síntesi proteica però la podria afavorir en alguns mRNA de neurones en procés de diferenciació (Kindler *et al.* 2005).

18.3. Terminació:

El factor eRF1 reconeix un dels tres codons *stop* i catalitza el final de la traducció unint-se al ribosoma en lloc del tRNA. Aquest fet juntament amb l'eRF3 estimula la hidròlisi del GTP-ribosoma i allibera la cadena peptídica (Gkogkas, Sonenberg & Costa-Mattioli 2010)(Groppo, Richter 2009) (Zukin, Richter & Bagni 2009, Klann, Dever 2004)(Livingstone *et al.* 2010, Sutton, Schuman 2005),(Kindler *et al.* 2005).

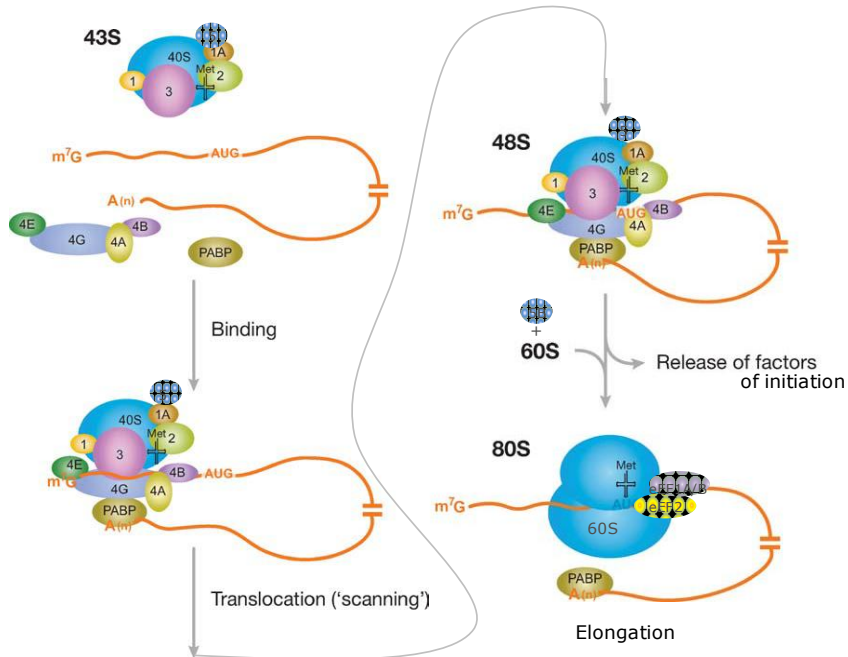


Figura 25. Inici de traducció Cap-dependent en eucariotes. Representació esquemàtica dels passos a l'inici de la traducció. Reclutament del complex de pre-inici 43S al mRNA per factors de la família eIF4 i la proteïna d'unió a la cadena poliA PABP, que resulten en la formació del complex 48S al codó d'inici AUG. Els números 1, 1A, 2, 3, 4A, 4B, 4E representen els diferents factors d'inici. La fase d'elongació comença quan es comença a formar la cadena peptídica (Kindler *et al.* 2005).

19. Control de la traducció a la sinapsi

No tots els mRNAs estan distribuïts ubiquament, sinó que n'hi ha que es localitzen en regions subcel·lulars específiques. Aquest procés no és exclusiu de les neurones diferenciades sinó que també es dona en altres cèl·lules polaritzades, tant en el desenvolupament embrionari (incloent-hi el neuronal) com durant la divisió cel·lular (Bashirullah, Cooperstock & Lipshitz 1998).

Les primeres indicacions que les dendrites tenen control autònom de la traducció es van trobar quan s'hi van descobrir complexos de poliribosomes (Steward, Levy 1982). El 1987 es va demostrar el transport actiu d'mRNA cap a les dendrites (Davis, Banker & Steward 1987), i posteriorment es va observar que en làmines de parafina de dendrites

hipocampals de conills d'índies hi havia incorporació d'aminoàcids marcats radioactivament (Feig, Lipton 1993). Però no va ser fins al 1996 que es va descobrir el primer paper funcional de la síntesi proteica a les dendrites: la síntesi proteica local a les dendrites es necessita per un augment ràpid de la transmissió sinàptica induïda per l'exposició a diferents estimuladors com per exemple el factor de creixement BDNF (Kang, Schuman 1996);(Sutton, Schuman 2006).

A les neurones dels vertebrats, la síntesi axonal proteica presinàptica ocorre durant el desenvolupament, i la traducció local es restringeix als llocs dendrítics postsinàptics de les neurones adultes (Poon, Martin 2009). La localització dels transcripts als cons axonals de creixement permet una ràpida resposta a senyals extracel·lulars durant el desenvolupament neuronal (Richter 2010). Els mRNAs que es tradueixen als cons axonals de creixement són diferents segons l'estat de desenvolupament en que es troben. Inicialment els mRNAs sintetitzats són els que codifiquen per la maquinària de traducció. Després es tradueixen mRNAs més complexos com ara les proteïnes relacionades amb la sinaptogènesi. Finalment, als axons adults el nivell de mRNA es redueix, així com també la presència de la maquinària de traducció. En el cas de la síntesi proteica a les dendrites, el moment màxim de traducció de mRNAs localitzats és durant la sinaptogènesi i disminueix en l'edat adulta (Swanger, Bassell 2011).

19.1. Partícules de ribonucleoproteïnes missatgeres (mRNP)

En tots els tipus cel·lulars s'observen diferents classes de grànuls de RNA. En les neurones, els grànuls es localitzen a les neurites en grans estructures denses electrònicament que contenen RNA i proteïnes (Khandjian *et al.* 2009). Hi ha tres tipus de RNPs (*ribonucleoprotein particles*) neuronals que s'han purificat i caracteritzat: els grànuls de transport, els grànuls d'estrès i els *Pbodies*.

19.1.1. Grànuls d'estrès i *Pbodies*

Els grànuls d'estrès o els *Pbodies* contenen cofactors que promouen la degradació de mRNA (DCP1/2, *Decapping complex 1, 2*) (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004); (Anderson, Kedersha 2006); (Kiebler, Bassell 2006); (Besse, Ephrussi 2008, Martin, Ephrussi 2009)). Tot i compartir alguns

CAPÍTOL II - INTRODUCCIÓ

components amb els grànuls de transport, són entitats diferenciades. Els grànuls d'estrès són d'emmagatzematge d'RNA on l'RNA queda estancat quan la cèl·lula està sotmesa a algun tipus d'estrès i l'allibera quan la cèl·lula recupera la normalitat, i els *Pbodies* són estructures de silenciament i degradació d'RNA, els quals contenen micro RNAs (miRNA) (Kiebler, Bassell 2006)(Besse, Ephrussi 2008). La població de les mRNPs és heterogènia i dinàmica, i podria ser responsable de la transició entre els estats de repressió traduccional, activació i degradació (Wang, Martin & Zukin 2010). Segons Anderson, Kedersha 2009, els diferents tipus de grànuls de RNA poden interaccionar momentàniament els uns amb els altres, implicant que els mRNAs, microRNAs i piwiRNAs (smallRNA) i les seves proteïnes associades es puguin moure d'un grànul a un altre suggerint que els grànuls d'RNA no només serveixen per transportar l'mRNA (Poon, Martin 2009).

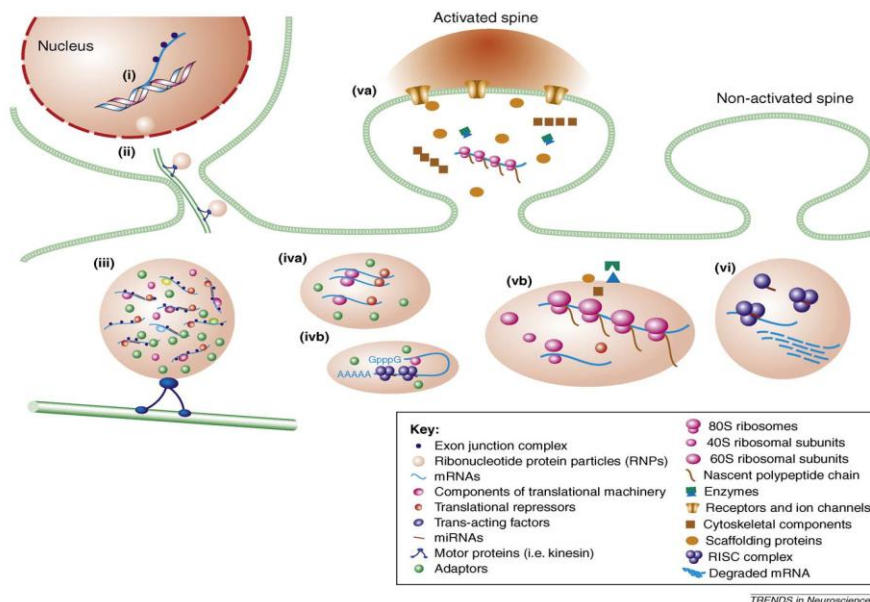


Figura 26. Model de transport i regulació de la traducció local de l'mRNA a les dendrites. (i.) Transcripció d'mRNAs i reclutament co-transcripcional de factors en trans.(ii.) Assamblatge i exportació d'RNPs. (iii.) L'RNP citoplasmàtic es transporta pels microtúbuls formant grànuls de transport (mRNA, maquinària de traducció incloent repressors de la traducció, proteïnes d'unió a RNA, miRNA i proteïnes motores (quinesines, dineïnes). (iv.) Els mRNAs es mantenen en un estat reprimat a través de: (iva), repressió a través de la unió de l'mRNA amb repressors de la traducció; (ivb), repressió a través de la unió del mRNA a miRNAs per formar el complex RISC en estructures anomenades P-bodies. (va.) L'activació dels receptors neurotransmissors i dels canals depenents del voltatge d'ions involucra vies secundàries intracel·lulars com

la via mTOR que promou la traducció. (vb,) Traducció activa en una sinapsi. (vi.) Degradació local dels mRNAs. Els miRNA-RISC regulen la degradació dels mRNAs als P-bodies (Wang, Martin & Zukin 2010).

19.1.2. Grànuls de transport d'mRNAs

Els grànuls de transport també anomenats mRNP (*messenger ribonucleoprotein particle*) de transport són diferents dels grànuls d'estrès (DICTENBERG *et al.* 2008). Durant el transport dels mRNAs, la seva traducció està reprimida i s'activa en llocs concrets com a resposta als senyals sinàptics (Huang, Richter 2004)(Bramham, Wells 2007, Bramham 2008)(Sossin, Lacaille 2010).

El mecanisme responsable del trànsit d'mRNAs a les dendrites implica el reconeixement d'elements en *cis* a la regió del 3'UTR per part de proteïnes d'unió a l'RNA (RBPs, *trans-acting*) (Behar *et al.* 1995), que alhora interaccionen amb sistemes de transport als microtúbuls, formant grànuls de transport d'RNA (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004)(Besse, Ephrussi 2008, Hieronymus, Silver 2004). Hi ha diferents maneres de promoure la localització de l'mRNA a llocs determinats a través d'elements en *cis*, al 3'UTR: la primera i la més comú és per transport actiu, portant el transcrit a la regió subcel·lular adequada a través de la seva identificació per factors en *trans*. La segona és mitjançant l'estabilització de l'mRNA (si es troba en el lloc adequat) i/o degradació (Martin, Ephrussi 2009).

Els primers grànuls de transport d'mRNA es van identificar al 1993 en cèl·lules cultivades d'oligodendròcits (Ainger *et al.* 1993), però no va ser fins al cap de 3 anys que es va trobar la primera evidència de l'existència de RNPs de transport, observant moviments dinàmics de grànuls de RNA endogen a un ritme molt semblant al de l'RNA a les dendrites de neurones corticals (Knowles *et al.* 1996).

Els grànuls d'RNA es transporten pel citoesquelet dels microtúbuls i, així, aquest serveix d'ancoratge i guia, permetent la seva localització en regions llunyanes de la dendrita (Knowles *et al.* 1996). Els microfilaments d'actina també contribueixen a la localització del grànul, situant-lo a les espines sinàptiques (Bassell, Singer 2001) (Bramham, Wells 2007). Els mRNP de transport es mouen pels microtúbuls amb l'ajuda de proteïnes motores com les quinesines i les dineïnes (Carson, Cui & Barbaresi 2001)(Hirokawa

CAPÍTOL II - INTRODUCCIÓ

2006),(Hirokawa, Takemura 2005),(Ainger *et al.* 1997),(Knowles *et al.* 1996),(Muslimov *et al.* 1997)(Kohrmann *et al.* 1999) (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004). Els grànuls es transporten a una velocitat que oscil·la entre 5-6µm/min, velocitat comparable a la de les quinesines. Les quinesines presenten un moviment cap a l'extrem positiu dels microtúbuls (anterògrad), mentre que les dineïnes s'encarreguen del moviment retrògrad (Carson, Cui & Barbarese 2001).

El transport de grànuls d'RNA depenent del citoesquelet de tubulina es pot potenciar per l'efecte de neurotrofines com el NT3 (Knowles, Kosik 1997) i el BDNF (Righi, Tongiorgi & Cattaneo 2000), o per estímuls despolaritzants de la neurona com és l'addició de KCl (Krichevsky, Kosik 2001)(Kim *et al.* 2005),(Antar *et al.* 2004) (Ben Fredj *et al.* 2004)(Bramham, Wells 2007), (Kiebler, Bassell 2006, Martin, Ephrussi 2009).

20. Composició dels grànuls de transport d'RNA

Encara no es coneix exactament el nombre ni la identitat de totes les proteïnes que s'associen a l'mRNA durant el seu transport. Estructuralment, els mRNPs de transport apareixen com a agregats propers entre sí de mRNAs, proteïnes d'unió a l'RNA, ribosomes, factors de traducció i factors d'estabilització de l'mRNA com Staufen, (Elvira *et al.* 2006) (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004)(Krichevsky, Kosik 2001). Staufen, una de les primeres proteïnes caracteritzades d'aquestes estructures, ha esdevingut una proteïna marcador de grànuls d'RNA (Kohrmann *et al.* 1999) (Mallardo *et al.* 2003). Els grànuls d'RNA cofracionen amb quinesines i no estan associats a membranes, suggerint que aquests són els que es poden observar per microscopia amb un patró puntejat a les dendrites i els responsables del transport de l'mRNA que transporta (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004),(Mallardo *et al.* 2003), (Kiebler, Bassell 2006). Un cop l'mRNA arriba al seu destí sinàptic, necessita la maquinària de traducció incloent-hi els ribosomes, siguin de nova biogènesi o siguin transportats prèviament.

Darrerament s'ha fet un gran esforç per intentar caracteritzar els components dels grànuls de transport de RNA. Tot i que és més probable que cada grànul de transport sigui específic i porti unes determinades proteïnes i mRNAs (Mikl, Vendra & Kiebler 2011), s'han trobat al voltant de 500 milions de proteïnes diferents en aquestes estructures (Cajigas *et al.* 2012, Elvira *et al.* 2006) i uns 2200 mRNAs diferents localitzats de forma puntejada a les dendrites, no només implicats en la plasticitat sinàptica sinó també en rols de metabolisme cel·lular (Cajigas *et al.* 2012, Sutton, Schuman 2006)(Zhong, Zhang & Bloch 2006). Analitzant les proteïnes i els mRNAs associats als grànuls d'RNA a través de fraccionaments en gradients de sacarosa i eliminant vesícules i polisomes s'ha trobat que el 80% de les proteïnes identificades són proteïnes ribosomals o proteïnes associades a ribosomes. També abunden les proteïnes d'unió a l'RNA i proteïnes del citoesquelet (Elvira *et al.* 2006).

Segons el grup de Hirokawa i el de Martin KC., dins d'un grànul de RNA hi ha dos tipus de proteïnes, les que són comunes i essencials per a la formació del grànul i el seu transport (com Puro, hnRNP-U, PSF, Staufén) (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004); (Poon, Martin 2009), la inhibició de les quals deteriora la localització dels mRNAs que transportaven, i les especialitzades pel tipus cel·lular o pels mRNAs que transporten, regulant la seva traducció (pex. pel mRNA de CaMKIIa, ho podrien ser la DDX3, la SYNCRIPT o la CPEB (Richter 2007);(Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004), o la ZBP1/2 per l'mRNA de β -actina. A la **Taula 1** s'anomenen les principals proteïnes i mRNAs que formen part dels grànuls de transport de mRNA caracteritzades fins al moment:

CAPÍTOL II - INTRODUCCIÓ

Proteïnes Ribosomals	~33%
Proteïnes d'unió al RNA	hnRNPs-(U, A1,A2,C, R1, K, C, L, X, H, A0, A3, M, SYNCRIPT, ZBP1)
	interleukin
	FMRP
	CPEB
	CYFIP
	PABP
	mYB-1b
	NonO
Proteïnes de transport	Staufen1/2
	PSF
	hnRNP-U
	Pura/ β
Helicasses Dead-box	DDX1/3
	eIF4A
Proteïnes motores	KIF3A
	KIF5A
	Dynein
Proteïnes ELAV-like	Hu-(B/D/C)
Factors de traducció	eIF3s (2, 4,5,6, 7, 10,11)
	eIF3s6IP
	eIF2, 2A,2B, 2a)
	eIF5A
	eEF1($\alpha,\beta,\gamma,\delta$)
	eEF2
Proteïnes Citoesquelet	Tubulin α,β
	MAP2
	Dynein complex
	Actina
	Septina
Altres	RNG105
Inhibidor RNase	Rnasa Inhibitor L
	mRNAs per les proteïnes ribosomals
	dendrin
	MAP2
mRNAs	CaMKII α
	β -actin
	BDNF
	MBP
	Arc
	TrkB
	NMDAR1
	AMPA gluR
	Tau
	PSD-95
	SAPAP4
	BC1

Taula 1. Principals proteïnes o mRNAs identificades en grànuls de transport d'RNA (Knowles *et al.* 1996), (Krichevsky, Kosik 2001), (Aronov *et al.* 2002)(Huang *et al.* 2003)(Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004)(Shiina, Shinkura & Tokunaga 2005)(Hirokawa 2006),(Elvira *et al.* 2006)(Bramham, Wells 2007),(Zalfa *et al.* 2007), (Poon, Martin 2009) (Cajigas *et al.* 2012)

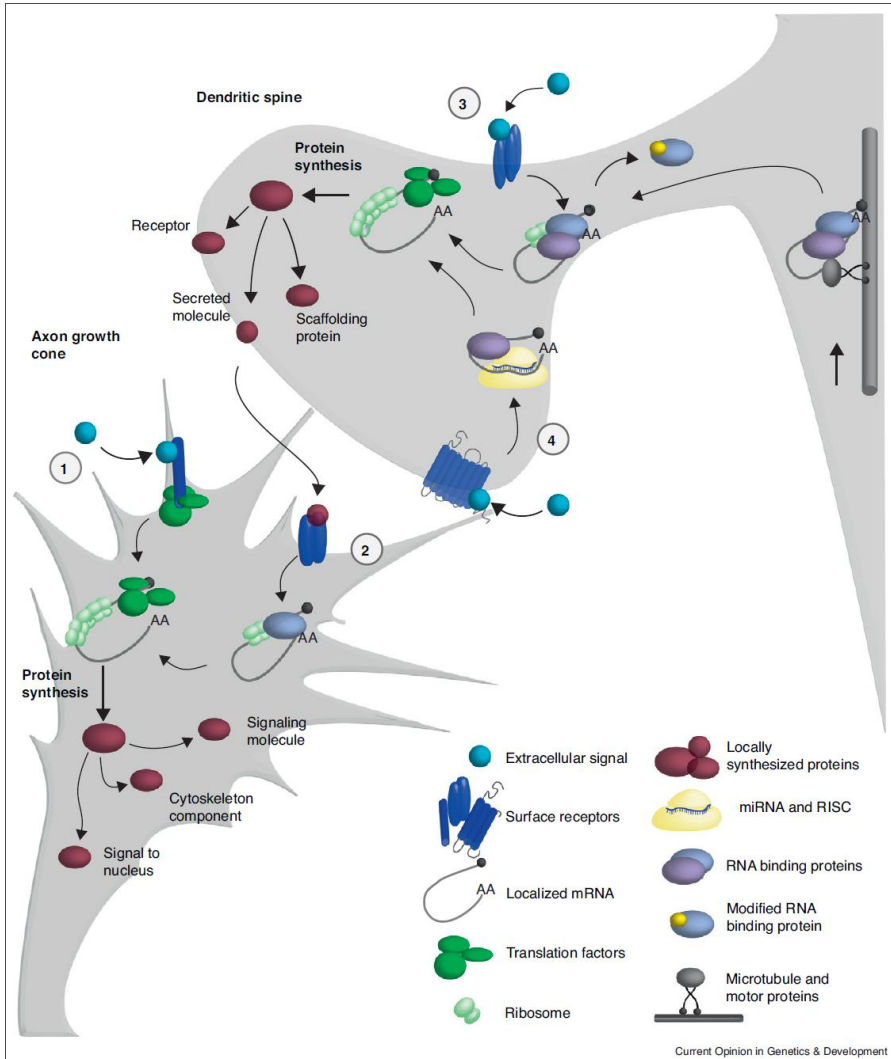


Figura 27. Regulació de la traducció local de l'mRNA als cons de creixement axonal i en la morfogènesi de les espines sinàptiques. Es mostren els mecanismes que controlen el transport de l'mRNA i la traducció als axons en desenvolupament i a les dendrites. A la dreta de la imatge observem un microtúbul, en el que hi viatja una proteïna motora i la seva càrrega: mRNA, proteïnes adaptadores i reguladores de la traducció i d'unió al mRNA. (1) Al con axonal, els senyals sinàptics a través dels seus receptors, activen la maquinària de traducció. (2) Una molècula secretada des de la part post-sinàptica pot activar la traducció pre-sinàptica regulant les proteïnes d'unió al mRNA. (3) Els mRNAs localitzats es poden regular per diferents mecanismes quan un senyal sinàptic activa un receptor, aquest pot produir

CAPÍTOL II - INTRODUCCIÓ

modificacions post-traduccionals a les proteïnes d'unió a l'RNA i provocar de-repressió. (4) Els miRNA i RISC inhibeixen la traducció a les dendrites i a través de la senyalització als receptors post-sinàptics es poden alliberar els miRNA i promoure la seva traducció. Les proteïnes sintetitzades inclouen diversos tipus de molècules amb funcions locals o llunyanes (Swanger, Bassell 2011).

Els grànuls d'RNA no tenen membrana lipídica, diferenciant-los així de les vesícules (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004)). Tenen una mida d'entre 0,6 i 0,8µm i algunes anàlisis bioquímiques suggereixen que hi podria haver al voltant de 40 proteïnes diferents formant els diversos grànuls de transport (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004). Tot i que inicialment es pensava que a cada grànul podia haver-hi unes 30 molècules de RNA (Fusco *et al.* 2003), segons un estudi recent de l'equip de Kiebler es suggereix que els mRNA de MAP2, CaMKIIα i de β-actina pertanyen a RNPs independents, i a més el nombre de molècules d'RNA és baix, generalment al voltant d'una o dues, indicant que els grànuls de transport són més heterogenis i menys complexos del que s'havia pensat inicialment (Mikl, Vendra & Kiebler 2011). Sutton, Schuman 2006 va proposar la possibilitat d'haver-hi poques molècules de RNA al grànul, ja que calculant les dimensions dels eixos dendrítics i de les espines sinàptiques no hi podria haver més d'un o dos polisomes funcionals, i per tant estar-se traduint al mateix temps una o dues molècules de RNA. D'altra banda, també s'ha proposat un model on a la base de diversos botons sinàptics s'emmagatzamessin mRNAs en partícules RNP i segons l'activitat que una sinapsi desenvolupés es transportessin fins a la densitat postsinàptica els mRNAs requerits (Doyle, Kiebler 2011).

21. Repressió de la traducció durant el transport d'mRNA

La traducció localitzada dels mRNAs està regulada per diferents mecanismes. Cada mRNA transportat conté múltiples elements reguladors. El control de l'mRNA integra diversos estímuls per regular la seva síntesi proteica. Alguns elements *cis-acting* del 3'UTR del mRNA interaccionen amb elements *trans-acting* que inhibeixen la seva traducció (Richter 2010). Un dels principals mecanismes de control negatiu de la traducció dels mRNAs és

el control de la fase d'inici de la traducció de les proteïnes cap-dependents, concretament evitant la unió dels factors eIF4G amb l'eIF4E.

21.1. eIF4E-binding proteins (4E-BP)

La família **4E-BP** competeix amb el factor d'inici eIF4G per associar-se amb l'eIF4E i així evita la formació del complex eIF4F (eIF4A, eIF4E, eIF4G) inhibint l'inici de la traducció. L'estimulació per BDNF activa l'mTOR (a través de la via TrkB/PI3K/mTor), el qual pot fosforilar el 4E-BP. Aquesta fosforilació evita la interacció amb l'eIF4E permetent així la unió de eIF4G i eIF4E i la progressió de la traducció (Richter, Sonenberg 2005)(Costa-Mattioli *et al.* 2009)(Sossin, Lacaille 2010).

21.2. Proteïnes que actuen com una 4E-BP (4E-BP like proteins):

En alguns mRNAs la repressió de la traducció succeeix evitant també la formació del complex eIF4G-eIF4E a través de proteïnes tipus 4E-BP com la CPEB (*cytoplasmic polyadenylation element-binding protein*) (Richter 2010, Bagni 2008, Richter 2007).

CPEB (*cytoplasmic polyadenylation element-binding protein*)

21.2.1. CPEB (*Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein*)

21.2.1.1 CPEB1

La CPEB1 s'expressa al cervell, on es troba expressada al soma i a les dendrites de les neurones de l'hipocamp de ratolí, així com també al còrtex (Huang *et al.* 2002); (Wu *et al.* 1998). S'uneix al motiu CPE (*cytoplasmic polyadenylation element*) (**Figura 28**) de l'mRNA bloquejant la unió del factor eIF4G al factor eIF4E a través de la seva unió amb proteïnes tipus 4E-BP (Maskin/neuroguidin, Cup) i reprimeix la traducció de l'mRNA (Zukin, Richter & Bagni 2009). L'estimulació d'Aurora Quinasa A, a través de l'activació de receptors com el NMDAR, fosforila la CPEB1 a la serina 174 (Mendez *et al.* 2000) (Huang *et al.* 2002). Un cop fosforilada, la CPEB1 millora la seva afinitat pel CPSF (*cleavage and polyadenylation factor*), el

CAPÍTOL II - INTRODUCCIÓ

qual s'uneix a la seqüència AAUAAA propera al CPE, i les proteïnes tipus 4E-BP es desacoblen. Seguidament es reuneix la maquinària i els components de poliadenilació (Barnard *et al.* 2004)(Takagaki, Manley 2000, Kim, Richter 2006), es recluta una poli(A) polimerasa (Kim, Richter 2006) que durà a terme l'elongació de la cua poliA, creant llocs nous d'unió per a la PABP (*Polyadenylation Binding Protein*), que reclutarà l'eIF4G i permetrà així l'inici de la traducció (Klann, Dever 2004, Richter 2007)(Oe, Yoneda 2010)(Kim, Richter 2006).

D'aquesta manera s'impedeix la traducció prematura de l'mRNA transportat (com per exemple el de CaMKII α , el Map1b, el BDNF o l'App (Richter 2010, Bagni 2008, Richter 2007) (Oe, Yoneda 2010)), la conseqüent degradació i els mRNAs només són traduïbles quan arriben a la seva localització final on l'activitat sinàptica regula l'activació de la traducció (Sutton, Schuman 2005) (Kindler *et al.* 2005)(Richter 2010).

21.2.1.2 CPEB 2-4

Tots els vertebrats tenen 3 gens addicionals tipus CPEB: la CPEB2, la CPEB3 i la CPEB4. Totes 3 són proteïnes paràlogues molt semblants entre elles classificades com a subfamília CPEB2 (Morgan, Iaconcig & Muro 2010) (Wang, Cooper 2010). Les CPEB-2, -3 i -4 contenen un lloc d'unió a RNA diferent del que té CPEB1 i en conseqüència, s'uneixen a mRNAs distints als que ho fa la CPEB1. La CPEB3 s'uneix a l'mRNA de les proteïnes GluA1 i GluA2 i en reprimeix la seva traducció (Huang *et al.* 2006)(Morgan, Iaconcig & Muro 2010). A més, la CPEB3 interacciona amb la *Neuralized* (Neur1), una ubiquïtina-lligasa (E3) que, a part d'estar implicada en degradació proteica, també se li ha associat una funció no degradativa. La Neur1 monoubiquïtinitza CPEB3 i reverteix la seva funció inhibidora de la traducció. Quan la CPEB3 no està ubiquïtinada s'indueixen cues de poli(A) curtes, mentre que quan la Neur1 li afegeix la proteïna ubiquïtina s'observen cues de poli(A) més llargues i un augment de traducció de les proteïnes GluA1 i GluA2, dues proteïnes que incrementen el nombre d'espines sinàptiques i ajuden en la plasticitat sinàptica (Pavlopoulos *et al.* 2011).

21.2.2. *Fragil X Mental Retardation Protein (FMRP)*

El silenciament de la *Fragil X Mental Retardation Protein* és el responsable del retard mental FXS (*Fragil X Syndrome*). Aquest està causat per la repetició del triplet CGG al promotor del gen FMR1 (que codifica per la proteïna FMRP), provocant la metilació del DNA i el conseqüent silenciament proteïc. A nivell d'estructura, la FMRP conté dos dominis KH (homòleg a hnRNP-K) i una caixa RGG els quals són tots dominis d'unió a RNA (Darnell *et al.* 2005, Darnell *et al.* 2001). També té un senyal de localització nuclear (NLS) i un senyal d'exportació nuclear depenent de CRM1 (NES) (Tamanini *et al.* 1999). Tot i que una petita part de la FMRP es pot trobar al nucli, la major part de la proteïna és citoplasmàtica associada a poliribosomes a través de l'mRNA, formant part dels complexos d'mRNP (Feng *et al.* 1997). La FMRP és una proteïna transportadora d'mRNA del nucli al citoplasma (Kim, Bellini & Ceman 2009) a més de ser una inhibidora de la traducció i estabilitzadora de l'mRNA (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004);(Bardoni, Schenck & Mandel 1999)(Antar *et al.* 2005)(Li *et al.* 2001).

La FMRP, a més, s'uneix a la proteïna motora KIF5 a través de la unió indirecta de KLC, la cadena lleugera de la quinesina la qual s'uneix al domini de la cua de les KIF5s. La KIF5 ha estat descrita com una de les proteïnes motores dels mRNP de transport. Aquesta associació es veu incrementada amb l'estimulació dels receptors de glutamat (mGluR) ja que la FMRP és una diana del grup I dels mGluRs. (Hirokawa, Niwa & Tanaka 2010). En mutants *K.O.* de la FMRP, la translocació de l'mRNA com el de la CaMKIIa i el de la SAPAP2, 3 i 4 a les dendrites i la conseqüent sinaptogènesi es troba afectada, cosa que suggereix, que la disrupció del KIF5 podria estar involucrada en la patogenicitat de la Síndrome X-Fràgil (Dictenberg *et al.* 2008)(Hirokawa, Niwa & Tanaka 2010, Kao *et al.* 2010).

L'aplicació d'agonistes dels mGluRs com DHPG, augmenta la síntesi proteica depenent de la LTP, indicant que l'estimulació d'aquests receptors podria desreprimir la inhibició de la traducció (Richter 2010). De fet, la fosforilació d'una serina conservada de la FMRP està relacionada amb l'aturada de la traducció, mentre que els efectes de l'estimulació per agonistes del grup I de mGluRs causen una desfosforilació ràpida de la FMRP a l'augmentar l'expressió de la fosfatasa PP2A. D'altra banda, quan la FMRP

CAPÍTOL II - INTRODUCCIÓ

està fosforilada augmenta l'activitat de la via ERK-PI3K-mTor i baixa l'activitat de la citada fosfatasa, entenent que la fosforilació de la FMRP a la citada serina, és crucial pel control de la seva activitat repressora a la traducció (Narayanan *et al.* 2007). Ho demostren en un *KO* de *frm1* on s'ha comprovat que la inhibició de l'mGluR5 corregeix l'excessiva síntesi dels mRNAs que en condicions normals inhibeix la FMRP (Osterweil *et al.* 2010).

Un altre mètode complementari d'inhibició de la traducció són els miRNAs i els RISC (*RNA-induced silencing complex*). S'han identificat diversos miRNA en neurones hipocampals com miR-125, miR-138 o miR-134 (Muddashetty *et al.* 2011). El miR-125a juntament amb la proteïna AGO2 del complex RISC, coopera amb la FMRP fosforilada per reprimir la traducció local de l'mRNA de PSD-95. L'activació de l'mGluR permet la desfosforilació de la FMRP, l'alliberació del miR-125a i la traducció de la PSD-95 (Muddashetty *et al.* 2011). L'absència de fosforilació de la FMRP per la quinasa S6K1 imita la pèrdua de la FMRP, augmentant l'expressió del SAPAP3, un mRNA sinàptic associat a la FMRP (Narayanan *et al.* 2008). A més a més, en la fracció PSD (*Post Synaptic Density*) hipocampal de ratolins post-natals *Knock Out (K.O.)* de FMRP, s'ha observat un augment en l'expressió de les proteïnes SAPAP2, SAPAP3 i IRSp53 (Schutt *et al.* 2009), així com de la PSD-95 (Muddashetty *et al.* 2011).

La FMRP és una proteïna estabilitzadora d'alguns mRNAs com el de PSD-95 o el de la MBP en neurones hipocampals i en glia respectivament (Zalfa *et al.* 2007, De Rubeis, Bagni 2010), aquesta estabilització podria deure's al fet que dins la seqüència de com a mínim l'mRNA de la PSD-95 es troben dos elements AREs. Aquestes seqüències s'uneixen amb proteïnes d'unió a AREs bloquejant (o permetent, segons condicions ambientals o de desenvolupament) l'accés de la maquinària de degradació de l'mRNA. Una manera de bloquejar-la és unint l'extrem 5' de l'mRNA amb la cua poliA a través del complex PABP-eIF4G. Això forma un anell tancat no accessible per les exonucleases, evitant l'eliminació de la cua poliA i en definitiva, la degradació de l'mRNA. Aquesta unió es pot donar gràcies a proteïnes d'unió a elements AREs, com succeeix al sistema ben estudiat entre l'mRNA de GAP-43 i la proteïna estabilitzadora d'unió a AREs ELAV/HuD (Beckel-Mitchener *et al.* 2002). En el cas de la FMRP, s'ha demostrat la interacció de la FMRP amb el 3' UTR de l'mRNA de PSD-95 i es creu que a través d'altres proteïnes com

per exemple CYFIP1 podria unir-se al 5' de l'mRNA formant així l'anell tancat inaccessible per les exonucleases (De Rubeis, Bagni 2010).

21.2.3. FMRP-CYFIP-BC1

La proteïna FMRP, juntament amb la CYFIP1 (*cytoplasmic fragile-X mental retardation interacting protein*) i l'mRNA BC1, funcionen com una proteïna tipus 4E-BP evitant la formació del complex eIF4G-eIF4E i per tant evitant la traducció primerenca d'alguns mRNAs com en el cas de: Arc (*Activity-regulated cytoskeletal-associated protein*) (Napoli *et al.* 2008), CaMKIIa (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha*), Map1b (*Microtubule-associated protein 1B*), App (*amyloid beta (A4) precursor protein*) (De Rubeis, Bagni 2011, Lu *et al.* 2004, Lu *et al.* 2004)(Zalfa *et al.* 2003, Schrott *et al.* 2004)

La CYFIP1 (**Figura 28**) unint-se entre l'eIF4E i el FMRP evita la interacció d'eIF4E amb eIF4G (Richter, Klann 2009, Jung, Lorenz & Richter 2006, Stebbins-Boaz *et al.* 1999), (De Rubeis, Bagni 2010, De Rubeis, Bagni 2011)(Napoli *et al.* 2008). La majoria de les proteïnes d'unió a l'eIF4E tenen un motiu d'unió YXXXXLΦ, (on Φ és qualsevol aminoàcid hidrofòbic). Però en el cas de la CYFIP1 és diferent. En lloc d'unir-se a través d'aquest motiu, té un pèptid petit que pren una estructura terciària en forma de L, la qual estructuralment s'assembla al motiu citat anteriorment (Napoli *et al.* 2008).

Segons (De Rubeis, Bagni 2011), l'RNA del BC1 (small untranslated mRNA) pot intervenir en l'associació de mRNAs específics de la FMRP (**Figura 28**) actuant de pont entre el FMRP i mRNAs menys afins a aquesta proteïna. El BC1 s'uneix a certs RNAs i n'inhibeix la traducció, evitant la formació del complex 48S (Zalfa *et al.* 2007)). Per tant la pèrdua del BC1 afecta en diferents graus el reclutament d'mRNAs als grànuls on es troba la FMRP. En el laboratori de la C. Bagni, es descriu la metilació del BC1 al nucli, tot i que es pot unir a la FMRP la seva unió és més forta quan arriben a la sinapsi, on el BC1 no està metilat i es suggereix que podria estar regulant gens sinàptics i per tant plasticitat neuronal (Lacoux *et al.* 2012).

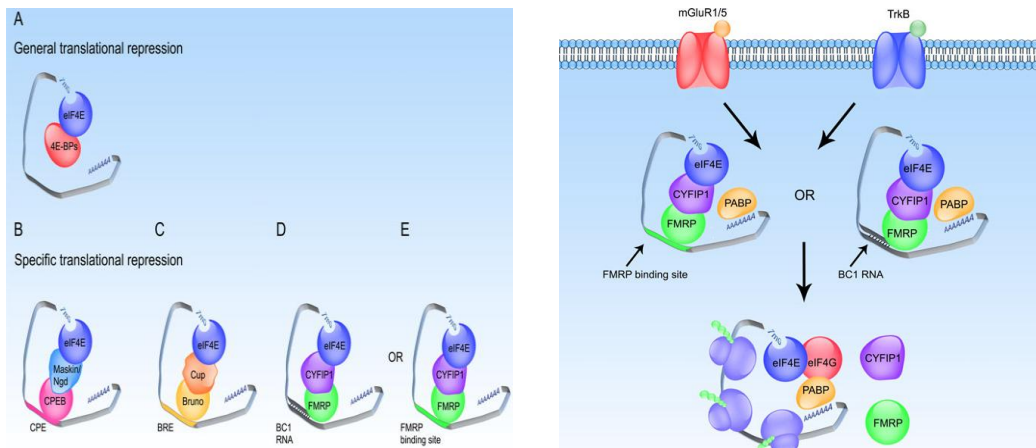


Figura 28. Representació dels diferents sistemes de bloqueig de la traducció per la CPEB, o la FMRP. Les proteïnes 4E-BP (Maskin, neuroguidín o Cup) segresten eIF4E i es recolzen sobre una proteïna d'unió a RNA CPEB (o Bruno en el cas de *Drosophila*) per inhibir la traducció dels mRNAs associats. La unió CYFIP-FMRP es comporta de forma similar. CYFIP subjecta l'mRNA associat amb FMRP reprimint la seva traducció. A través d'un estímul sinàptic s'alliberen la CYFIP1 i la FMRP i comença la traducció de l'mRNA inhibít (De Rubeis, Bagni 2011).

21.3. Altres proteïnes inhibidores de la traducció d'mRNAs

21.3.1. ZBP1

L'mRNA de la β -actina ha estat molt estudiat des del seu descobriment als cons de creixement axonal (Bassell *et al.* 1998). Al seu 3'UTR conté una seqüència anomenada *zipcode* que interacciona amb la proteïna ZBP1 (*zipcode binding protein*) inhibint-ne la seva traducció fins que arriba a l'axó guiada per la Netrina-1. La Netrina-1 és una proteïna que dirigeix la migració de l'axó unint-se al seu receptor transmembrana DCC, el qual estimula l'activació de Src. A més el DCC interacciona amb les subunitats dels ribosomes, els factors d'iniciació de la traducció i els monosomes, però no amb els polisomes (Tcherkezian *et al.* 2010). La ZBP1 permet una circularització de l'mRNA de la β -actina (Chao *et al.* 2010) de forma similar a com actua FMRP com a inhibidora de la traducció i estabilitzadora de l'mRNA. Sota l'estimulació del BDNF, la Src fosforila la ZBP1 permetent la seva dissociació amb l'mRNA i la conseqüent activació de la traducció (Elvira *et al.*

2006)(Sasaki *et al.* 2010), (Huttelmaier *et al.* 2005), (Welshans, Bassell 2011b).

La unió de la ZBP1 a la β -actina és específica però, en canvi, el mecanisme de dissociació de la maquinària de traducció del DCC podria regular qualsevol mRNA localitzat (Swanger, Bassell 2011).

21.3.2. eIF4AIII

Una altra proteïna que també reprimeix l'expressió dels mRNA als quals s'uneix és la proteïna helicasa DEAD box **eIF4AIII**. L'eIF4AIII és un membre del complex EJC (*exon junction complex*) que participa en el procés *d'splicing* unint exons al pre-mRNA i es transporta pel citoplasma amb l'mRNA un cop ha passat per *splicing* permetent la seva traducció si aquest es situa a l'ORF (*open reading frame*) o el condueix a la degradació per NMD (*Nonsense mediated mRNA decay*) si està situat més avall de la ORF. El complex EJC regula la degradació de certs mRNAs com per exemple el d'*arc* (Giorgi *et al.* 2007). D'aquesta manera els mRNAs es poden acumular en llocs llunyans del soma en dosis altes, com per exemple a les dendrites; allà poden estar a punt per ser traduïts quan reben un senyal extern que així ho indiqui. Un cop es tradueixen, s'activa la degradació del mRNA per TDD (*Translation-Dependent mRNA Decay*) la qual baixa la síntesi proteica produint una resposta traduccional específica limitada en el temps i en la quantitat (Giorgi *et al.* 2007)(Giorgi *et al.* 2007, Palacios *et al.* 2004, Le Hir *et al.* 2001). S'ha demostrat que eIF4AIII colocalitza en neurones amb l'mRNA d'*Arc* i quan s'inhibeix la síntesi de l'eIF4AIII augmenta la proteïna *Arc* (Giorgi *et al.* 2007).

21.3.3. eEF2

La fosforilació de l'eEF2 comporta com una reducció en la traducció a causa de la desunió del ribosoma a l'mRNA (Ryazanov, Shestakova & Natapov 1988)(Kanhema *et al.* 2006).

També s'ha descrit la interacció de FMRP amb el complex eEF2 i eEF2K (eEF2 Kinase) per modular la traducció del mRNA d'*Arc/Arg3.1* (Park *et al.* 2008).

22. Desrepressió de l'mRNA localitzat

La modificació que cada sinapsi pateix és independent una d'una altra, i és dependent de la seva estimulació. L'mRNA es comença a traduir quan l'estimulació de la neurona indueix la seva despolarització, el grànel es desfà, l'mRNA queda lliure de les proteïnes que estaven inhibint la seva traducció i s'activen les proteïnes responsables de l'inici de la traducció (**Figura 29**) (Richter 2010, Krichevsky, Kosik 2001, Mikl, Vendra & Kiebler 2011, Schuman, Dynes & Steward 2006).

Quan els grànuls d'RNA arriben a la seva destinació final es descarreguen pre- o postsinàpticament fins que la seva traducció s'activa a través d'estímuls fisiològics o de desenvolupament determinats per l'activitat neuronal. El mecanisme que activa la traducció a la sinapsi inclou l'activació de la maquinària de síntesi proteica a les dendrites i l'alliberament de la repressió de mRNAs específics (Khandjian *et al.* 2009)

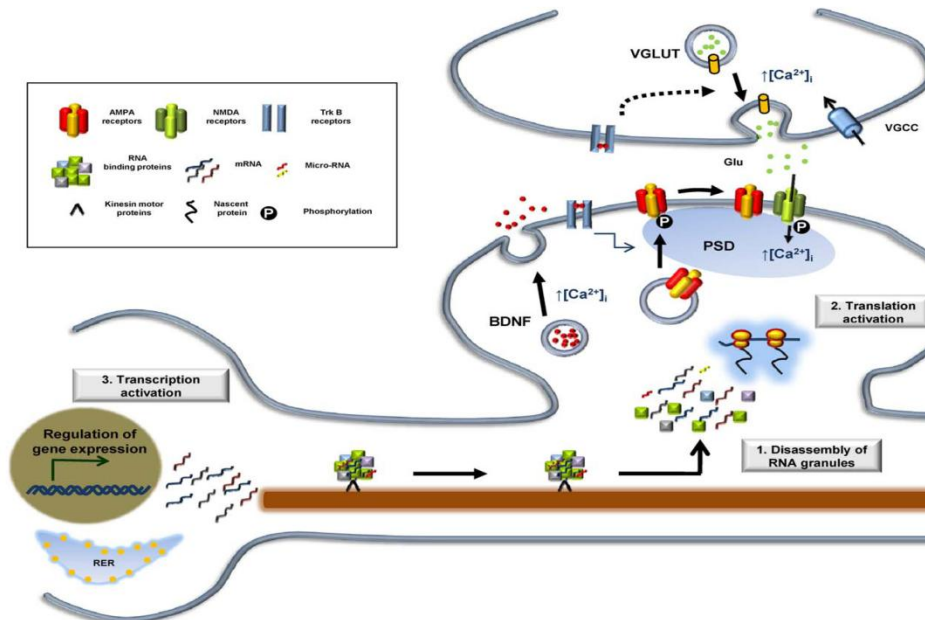


Figura 29. Traducció dels mRNA dendrítica induïda pel BDNF. El BDNF regula la transmissió sinàptica glutamaèrgica actuant a nivell pre- i post- sinàptic. Es desprèn de les vesícules secretòries a la regió post-sinàptica a través d'un mecanisme dependent de Ca^{2+} seguit per l'activació dels receptors de glutamat. Un cop és alliberat, el BDNF s'uneix als receptors TrkB potenciant l'alliberació de glutamat i produint així un efecte a curt o llarg plaç a la cèl·lula post-sinàptica. El BDNF induïx la translocació dels receptors AMPA a la sinapsi incrementant l'activitat dels receptors NMDA de manera

depenent de fosforilació. El BDNF indueix la síntesi proteica local dels mRNAs transportats al llarg de les dendrites en grànuls d'RNA, promovent la seva dissociació i activant la maquinària de traducció, la qual també regula el transport de RNA a través de les quinesines i activa l'expressió de determinats gens (Santos, Comprido & Duarte 2010).

La traducció d'alguns mRNAs concrets (com per exemple el CaMKII) està induïda per neurotransmissors que exciten el receptor de NMDA. El BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*), augmenta la transmissió sinàptica i a més és necessari per a alguns tipus de LTP (*Long Term Potentiation*), la qual estimula la síntesi de proteïnes localitzades a les dendrites (Santos, Comprido & Duarte 2010);(Sutton, Schuman 2005);(Schuman, Dynes & Steward 2006). El BDNF, a més, estimula la via mTOR i de la ERK-MAPK a la sinapsi, permetent la fosforilació del factor eIF4E, el qual ajuda a la millora de l'eficiència de la traducció (Napoli *et al.* 2008). L'Akt facilita l'activació del mTOR, el qual desreprimeix eIF4E mitjançant la fosforilació de les 4E-BPs (Osterweil *et al.* 2010).

D'altra banda, l'activació per BDNF també estimula la Src, la qual fosforila la ZBP1 i en conseqüència desinhibeix la traducció de la β -actina (Sasaki *et al.* 2010)(Huttelmaier *et al.* 2005, Welshhans, Bassell 2011a).

23. KIS

23.1. Estructura

La proteïna KIS (*Kinase Interacting with Stathmin*), també anomenada UHMK1 o P-CIP2 (*Peptidyl-glycine Amidating Monooxygenase C-terminal Interacting Protein*), es va aïllar inicialment en un assaig de doble híbrid on s'utilitzà Stathmin d'esquer. La KIS és una serina/treonina quinasa amb un domini quinasa molt conservat a la part N-terminal entre els aminoàcids 18-305, i un domini a la part C-terminal de 98 aminoàcids descrit inicialment com a RRM (*RNA recognition motifs*), el qual es caracteritza per tenir dos submotius conservats, el RNP-1 i el RNP-2. La KIS presenta el 42% d'homologia amb el RRM de U2AF⁶⁵ una subunitat d'unió al RNA de 65KDa del factor d'*splicing* U2AF (Maucuer *et al.* 1997)(Maucuer, Camonis & Sobel 1995)(Maucuer *et al.* 1997)(Alam *et al.* 1996). Tot i que en KIS trobem

CAPÍTOL II - INTRODUCCIÓ

dues seqüències RNP als residus 321-327 i 368-376, l'elevada presència d'aminoàcids amb càrregues negatives suggereix que aquesta proteïna no interacciona amb l'RNA directament, però podria interaccionar amb proteïnes que s'associen amb l'RNA, ja que la regió responsable d'aquesta interacció a U2AF es troba conservada en KIS (Kielkopf, Lucke & Green 2004).

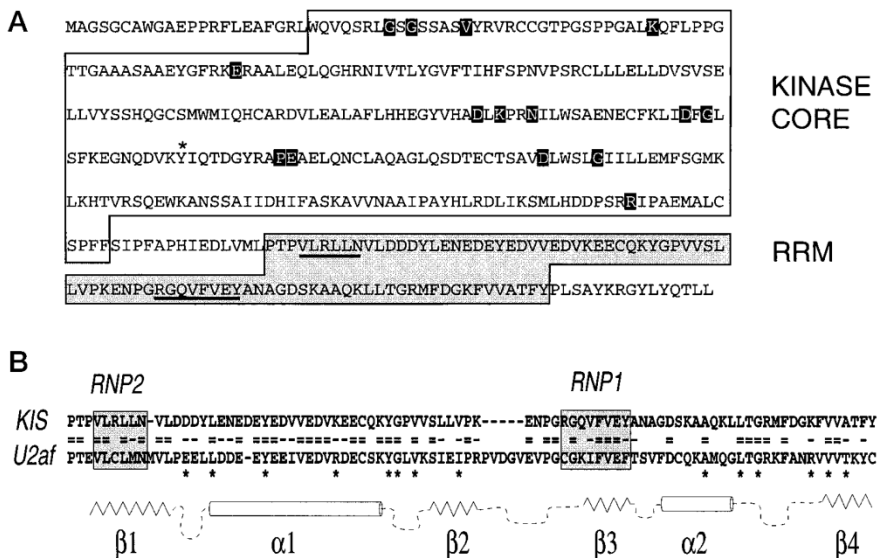


Figura 30. Anàlisi de la seqüència d'aminoàcids de la KIS de ratolí. (A) Es mostra el domini quinasa de l'N-terminal dins del primer requadre. Els aminoàcids (aa) marcats en negre són residus conservats a les quinases. El domini C-terminal es mostra enquadrat i en gris amb els dos dominis conservats RNP subratllats. (B) Alineament de l'extrem C-terminal de la KIS amb el domini C-terminal de U2AF. Els aminoàcids comuns estan marcats amb =, els aa similars estan marcats amb -, i els residus conservats d'unió a RNA situats fora dels RRM amb un *. S'indica també la possible estructura secundària d'aquests dominis (Maucuer *et al.* 1997).

La KIS, a nivell d'mRNA, s'expressa en ratolins i en humans a tots els teixits adults majoritàriament al sistema nerviós central. Es troba expressió a totes les regions del cervell però s'ha observat una intensitat més elevada a les capes corticals profundes, especialment al gir dentat i a les zones CA1, CA3 i CA4 de l'hipocamp. També se'n observa a les cèl·lules de Purkinje i a la capa granular del cerebel. La seva expressió al cervell va incrementant-se durant el desenvolupament embrionari fins la seva màxima expressió als 24 dies postnats. A nivell cel·lular es troba localitzat tant al nucli com al citoplasma (Langenickel *et al.* 2008);(Bieche *et al.* 2003);(Maucuer *et al.* 1997)(Bieche *et al.* 2003)(Bristow *et al.* 2009).

23.2. Funcions de la KIS

Fins al moment, s'ha relacionat la KIS amb la regulació de l'estabilitat dels microtúbuls, amb la progressió del cicle cel·lular i amb la formació del complex d'*splicing*. A través d'assajos quinasa *in vitro* fins al moment s'han identificat sis substrats que són fosforilats per la quinasa KIS: la *stathmin*, la sinapsina, la MBP (*Myelin Basic Protein*), la p27^{KIP1}, el factor d'*splicing* SF1 i la PAM (*Peptidyl-glycine aAmidating Monooxygenase*) (Alam *et al.* 1996)(Maucuer *et al.* 1997)(Maucuer *et al.* 2000, Manceau *et al.* 2006, Boehm *et al.* 2002). Tot i que la KIS fosforila aquestes proteïnes *in vitro*, en algun cas encara no se'n coneix la rellevància fisiològica.

23.2.1. Al Cicle cel·lular

23.2.1.1. Regulació de l'estabilització de microtúbuls

La *stathmin* és una proteïna citoplasmàtica que s'expressa ubiqüament sobretot durant el desenvolupament. És una proteïna implicada en el control de la proliferació cel·lular i de la migració desestabilitzant els microtúbuls i segrestant la tubulina per evitar polimerització de nou (Baldassarre *et al.* 2005, Giampietro *et al.* 2005). Durant la formació del fus mitòtic en la fase G2/M, *stathmin* deixa de ser activa i és fosforilada per diverses quinases entre elles KIS (Manceau *et al.* 1999). La KIS va ser identificada com una quinasa que interacciona amb *Stathmin* i promou la degradació d'*stathmin* al fosforilar-la a la serina 38. La fosforilació de la KIS a *Stathmin* evita l'excés d'acumulació d'*stathmin* activa a les cèl·lules musculars llises vasculares (VSMC), evitant una desestabilització de la tubulina citoplasmàtica, cosa que en redueix la seva migració i les prepara per entrar a la mitosi (Langenickel *et al.* 2008) (Maucuer *et al.* 1997)(Maucuer *et al.* 2000).

23.2.1.2. Translocació citoplasmàtica de la p27^{KIP1}

La p27^{KIP1} és una proteïna inhibidora de la progressió del cicle cel·lular amb nivells d'expressió màxims a la fase G0. A una línia de fibroblasts i posteriorment a cèl·lules de leucèmia, la KIS s'ha descrit com un regulador negatiu de les Cdks, inhibint la p27^{KIP1} a la fase G1 del cicle cel·lular a través de la fosforilació a la serina 10 de la citada proteïna.

CAPÍTOL II - INTRODUCCIÓ

D'aquesta manera promou la continuïtat del cicle cel·lular, i fa sortir a les cèl·lules de la fase G0 (Boehm *et al.* 2002). A les cèl·lules HEK293T deprivades de factors tròfics i a les que la proteïna p27^{KIP1} se situava al nucli, els fibroblasts estimulats amb mitògens produïen un augment dels nivells de la proteïna KIS que s'acumulava al nucli i fosforilava a p27^{KIP1}. Aquest fet generava l'exportació des del nucli al citoplasma de la p27^{KIP1} i la seva degradació, i permetia la transició del cicle cel·lular de G0/G1 (Petrovic *et al.* 2008) (Boehm *et al.* 2002)(Nakamura *et al.* 2008).

23.2.2. *Splicing*

La SF1 (*Splicing Factor 1*) és una proteïna involucrada en el reconeixement de les seqüències intròniques. Durant els primers experiments de sobreexpressió de la proteïna KIS es va observar, a les cèl·lules HEK293T, que la KIS se situava al nucli amb una distribució semblant a la dels complexos d'*splicing* (Maucuer *et al.* 1997). Més recentment s'ha demostrat en estudis *in vitro* que la KIS a través del seu domini UHM, interacciona i fosforila al factor d'*splicing* SF1 en dos residus SPSP permetent una millor unió a la U2AF⁶⁵ i millora la formació del complex U2AF⁶⁵-SF1-mRNA (Manceau *et al.* 2006).

24. ANTECEDENTS

24.1. La quinasa KIS en grànuls d'RNA i en traducció localitzada a les neurites

La KIS presenta una distribució nuclear i citoplasmàtica, distribuïda de manera puntejada per les neurites. Experiments previs del nostre laboratori fets en cultius de neurones corticals de ratolí mostren com la KIS interacciona amb dues proteïnes aïllades en grànuls d'RNA (Cambray *et al.* 2009), la proteïna motora KIF3A (Aronov *et al.* 2002) i el factor d'*splicing* NonO (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004).

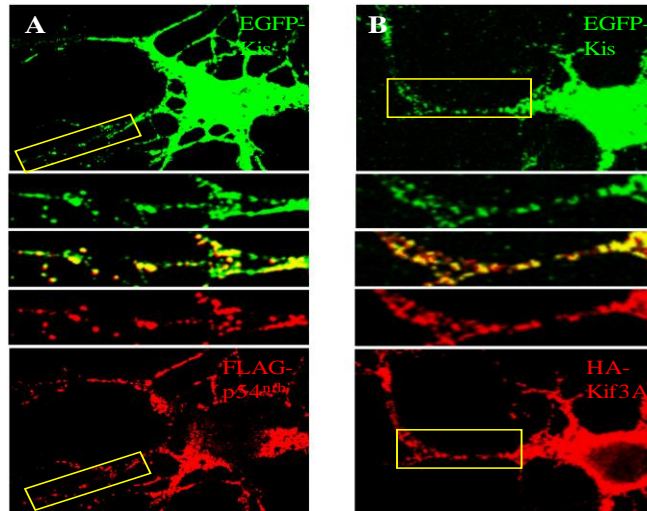


Figura 31. La KIS colocalitza amb la NonO i la KIF3A en neurones diferenciades. En neurones corticals de ratolí es mostra la colocalització de (A) NonO (p54^{nrb}) i (B) KIF3A amb KIS per immunofluorescència (Tesi Doctoral S.Cambray).

Es va comprovar la presència de la quinasa KIS a grànuls d'mRNA, colocalitzant per immunofluorescència i per coimmunoprecipitació la KIS amb la KIF3A o la NonO indicant que totes tres formaven part de la mateixa estructura (**Figura 31**). També es va demostrar la colocalització de la KIS amb RNA marcat amb SYTO14 (**Figura 32**) (Cambray *et al.* 2009).

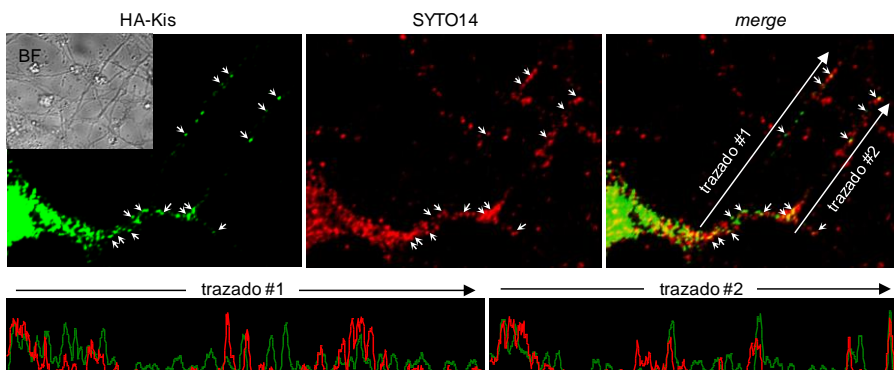
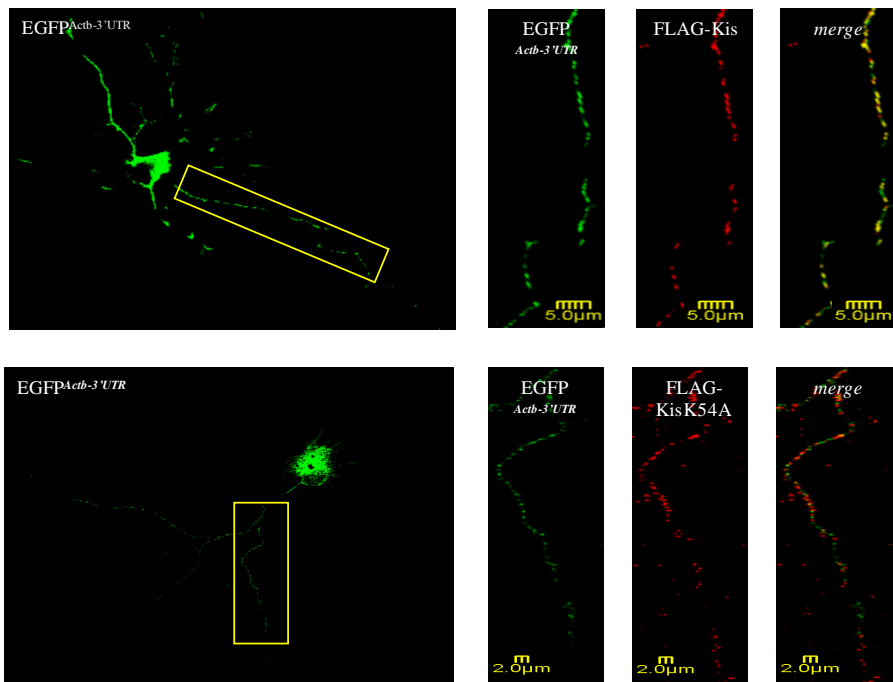


Figura 32. Colocalització de la KIS amb RNA. Neurones corticals de ratolí infectades amb lentivirus HA-KIS i marcades amb Syto14 per detectar RNA. A través de immunofluorescència amb ab α -HA es mostra la colocalització. En verd es mostra KIS-HA i en vermell Syto14. Els valors de fluorescència s'indiquen en les traces mostrades.

CAPÍTOL II - INTRODUCCIÓ

La KIS és una proteïna important pel creixement neurític. A la Tesi Doctoral de Serafí Cambray es va demostrar que la manca de la KIS en neurones corticals produïa neurones amb menys neurites per neurona i de menys longitud. A més, en aquest estudi es va comprovar la influència de l'activitat quinasa de la KIS en la traducció dels mRNAs que acompanyen al grànul de transport. Els 3'UTR dels mRNAs són estructures on s'uneixen moltes proteïnes d'interacció amb l'RNA per translocar-los al lloc on s'han de traduir (Aakalu *et al.* 2001, Eom *et al.* 2003, Kremerskothen *et al.* 2006). A (Cambray *et al.* 2009) es va colocalitzar la KIS amb la proteïna GFP fusionada al 3'UTR de la β -actina a les neurites de neurones corticals de ratolí (**Figura 33A**), indicant que la KIS a més de situar-se als grànuls de transport, també està present als llocs de traducció de l'mRNA transportat. Finalment, es va demostrar que l'activitat quinasa de la KIS és essencial per activar la traducció de GFP localitzada a les neurites mitjançant el sistema GFP fusionat al 3'UTR del mRNA de la β -actina **Figura 33B-E** (Cambray *et al.* 2009).

A



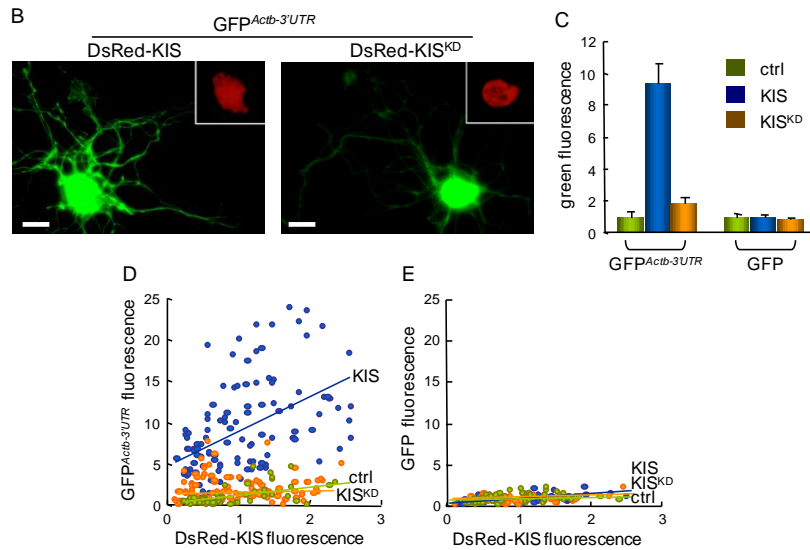


Figura 33. L'activitat quinasa de la KIS és important per estimular la traducció dependent del 3'UTR de la β -actina. (A) Colocalització de l'EGFP i la KIS o la KIS sense activitat quinasa (KD) en neurones corticals de ratolí de 4DIVS, transfectades amb EGFP^{Actb-3'UTR} i FLAG-KIS o FLAG-KISKD. En ambdós casos hi ha colocalització, però és menor amb la KIS sense funció quinasa. (B) Imatges de fluorescència *in vivo* de dues neurones representatives cotransfectades amb EGFP^{Actb-3'UTR} i DsRed fusionat a KIS o al mutant sense activitat quinasa de la KIS (KD). Barra de 10 μ m. (C) Quantificació de l'expressió de l'EGFP de les neurites normalitzada amb l'expressió al soma de DsRed de les neurones cotransfectades amb EGFP^{Actb-3'UTR} o EGFP i DsRed, DsRed-KIS o DsRed-KIS^{KD} n=50; $\alpha=0,01$. (D) Anàlisi de correlació entre valors normalitzats de l'EGFP^{Actb-3'UTR} neurític i valors normalitzats de DsRed, DsRed-KIS o DsRed-KIS^{KD} somàtic a les cèl·lules transfectades dels apartats B i C. (E) Anàlisi de correlació de valors normalitzats de GFP neurític i valors normalitzats de DsRed, DsRed-KIS o DsRed-KIS^{KD} somàtic en les cèl·lules transfectades de l'apartat C (Cambray *et al.* 2009).

A la Tesi Doctoral de S.Cambray es va dur a terme una anàlisi per doble-híbrid en la qual es buscaven interactors de la KIS. Entre d'altres es van aïllar la NonO, la KIF3A, factors de traducció, la Borealina i la NUFIP1. En la present Tesi doctoral s'han estudiat algunes d'aquestes proteïnes:

25. Borealina

La Borealina (o CDCA8) descrita fins al moment com una proteïna nuclear que pertany al complex CPC (*chromosomal passenger complex*) com la quinasa Aurora B, l'INCENP o la Survivin. El CPC és essencial en la regulació de la segregació dels cromosomes i la citocinesi i dóna estabilitat al

CAPÍTOL II - INTRODUCCIÓ

fus mitòtic bipolar (Kaur, Bekier & Taylor 2010)(Gassmann *et al.* 2004). Les modificacions post-traduccionals són molt importants per a la correcta localització i funcionament del complex. La Borealina pot estar fosforilada per Aurora quinasa B *in vitro* (Gassmann *et al.* 2004), (Hayama *et al.* 2007) donant estabilitat a la proteïna (Kaur, Bekier & Taylor 2010). Altres quinases com la quinasa MPK1 també poden fosforilar en altres residus els quals són importants per un correcte alineament entre els cromosomes (Jelluma *et al.* 2008). Per altra banda s'ha descrit que un altre membre de la família de les quinases Aurora quinasa A, fosforila la proteïna d'unió a RNA CPEB1, responsable de la poliadenilació de certs tipus de mRNA, permetent la continuació de la traducció localitzada prèviament bloquejada (Zukin, Richter & Bagni 2009, Klann, Dever 2004, Richter 2007)(Wang, Martin & Zukin 2010).

26. NUFIP1

La NUFIP1 (*Nuclear FMRP interacting protein 1*) és una proteïna d'unió a RNA que interacciona amb la FMRP (*Fragil X Mental Retardation Protein*). Totes dues mostren un perfil d'expressió semblant, sent present tant al nucli com al citoplasma. La FMRP és una proteïna transportadora d'mRNA del nucli al citoplasma (Kim, Bellini & Ceman 2009) a més de ser una inhibidora de la traducció i estabilitzadora de l'mRNA (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004);(Bardoni, Schenck & Mandel 1999)(Antar *et al.* 2005)(Li *et al.* 2001). La NUFIP1 conté un senyal CRM1 d'exportació nuclear i podria estar involucrada en l'exportació i la localització de mRNAs. Tot i que la seva localització és majoritàriament nuclear, també s'ha localitzat als sinaptoneurosomes colocalitzant amb els ribosomes, a les sinapsis actives i associada amb la FRMP (Bardoni *et al.* 2003).

OBJECTIUS

Com a continuació del treball iniciat al nostre laboratori sobre la implicació de la quinasa KIS en la traducció localitzada de mRNAs en neurones (Tesi Doctoral S.Cambray), vam plantejar-nos la hipòtesi que la proteïna KIS a través de la seva activitat quinasa, pogués fosforilar a algun dels components dels grànuls d'mRNA per ajudar a la traducció localitzada.

27. OBJECTIUS

Estudiar la implicació de la quinasa KIS en la traducció d'mRNAs localitzats a la sinapsi.

- a) Cercar nous components dels grànuls d'RNA que interaccionen amb la KIS així com mRNAs que es transporten en els mateixos grànuls d'RNA on es troba la KIS.
- b) Caracteritzar la regulació de l'activitat quinasa de la KIS i identificar-ne proteïnes substrat.

RESULTATS

28. La KIS co-immunoprecipita amb la KIF3A i mRNAs transportats en partícules RNP en extrems de cervell.

Al nostre laboratori es va demostrar que la proteïna KIS augmenta la traducció de l'mRNA de la GFP (*Green Fluorescent Protein*), fusionat al 3'UTR de l'mRNA de la β -actina (EGFP^{Actb-3'UTR}) el qual es localitza a les neurites. També es va demostrar que la KIS que la pèrdua de l'activitat quinasa de la KIS és necessària per a què activi la traducció de l'EGFP^{Actb-3'UTR} (*veure antecedents, Figura 33*).

Aquest resultat plantejava la hipòtesi que la proteïna KIS a través de la seva activitat quinasa participa en la progressió de la traducció dels mRNAs que es transporten amb ella als grànuls d'mRNA de manera localitzada. Per aprofundir en aquesta qüestió, vam identificar mRNAs que interaccionen amb la KIS i podrien estar transportats amb ella al llarg de les neurites. Per assolir aquest objectiu, primerament, vam dur a terme una immunoprecipitació endògena de la KIS en extrems de cervell de ratolins neonatals amb un anticòs produït en el nostre laboratori juntament amb l'empresa Antibody-BCN en conills immunitzats contra la proteïna sencera de KIS. En aquesta immunoprecipitació (IP) es va co-immunoprecipitar la proteïna KIF3A, que havíem identificat prèviament al laboratori com la proteïna motora del grànul d'mRNA on també es troba la KIS. Així vam comprovar la interacció d'aquestes dues proteïnes de manera endògena (**Figura 34A**), a més de servir-nos com a control positiu per verificar l'especificitat de la IP de la KIS. En paral·lel també vam provar de co-immunoprecipitar la proteïna KIS amb un anticòs contra la KIF3A sense èxit, probablement per la baixa eficiència d'immunoprecipitació de l'anticòs i per la poca quantitat de la KIF3A que interacciona amb la KIS. Molts dels mRNAs que van co-immunoprecipitar amb l'anticòs contra la KIS, codificaven per proteïnes implicades a la sinapsi: **ACTB**: β -actina; **GRIA1**, **GRIA2**: receptor de glutamat ionotòpic α 1 i 2; **Arc**: *Activity-regulated cytoskeletal-associated protein*; **MAPT**: microtubule-associated protein TAU; **MTAP2**:

CAPÍTOL II - RESULTATS

microtubule-associated protein; **NTRK2**: *neurotrophic tyrosin kinase receptor*, TrkB; **TFRC**: *transferrin receptor*; **CamKII α** : *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha*; **SYAP1**: *Synapse-associated protein* (Giorgi *et al.* 2007)(Giorgi, Moore 2007). Els mRNAs es van detectar per PCR quantitativa i es van relativitzar amb l'mRNA control de GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) i PGAM1 (*phosphoglycerate mutase 1*). Tal com s'observa a la **Figura 34B** la majoria dels mRNAs provats (ACTB; GRIA1, GRIA2; Arc; MAPT1, MAPT2; NTRK2; TFRC; CamKII α i SYAP1) tenen un enriquiment relatiu a l'mRNA de GAPDH d'unes quatre vegades o més respecte a la immunoprecipitació control, en la qual vam utilitzar sèrum preimmune enlloc de sèrum de conills immunitzats contra la KIS. Aquests resultats demostraven que la KIS es troba associada a diferents mRNAs presents també en grànuls de transport suggerint que KIS podria tenir una funció en el transport d'aquests mRNAs o en la seva traducció localitzada.

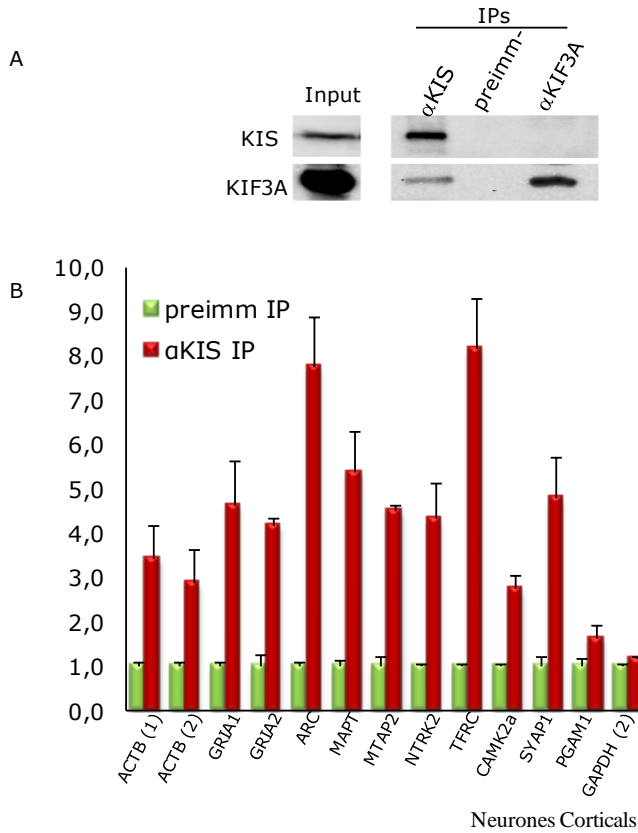


Figura 34. Associació de la KIS amb la KIF3A i mRNAs transportats per RNPs.

(A) Es va dur a terme una co-immunoprecipitació (IP) amb reïna de sefarosa CL4B-ProteïnaA als extrems de cervells homogenitzats de ratolins postnats de dia 1-2 els quals havien estat prèviament incubats amb l'anticòs de KIS, de KIF3A o amb el sèrum preimmune (pre-imm). Es van analitzar per *Western blot* les IPs i una mostra de l'input diluïda a 1/200 per detectar la KIS i la KIF3A endògenes amb els anticossos α -KIS o α -KIF3A. En el cas de la KIS es va utilitzar l'anticòs obtingut en conills contra tota la proteïna purificada al nostre laboratori. (B) Es van utilitzar les immunoprecipitacions realitzades amb l'anticòs de la KIS i el sèrum pre-immune per quantificar els nivells relatius dels mRNA indicats a continuació a través de PCR quantitativa. ACTB: *β -actina citoplasmàtica*, GRIA1: *glutamate receptor ionotropic alpha1*, GRIA2: *glutamate receptor ionotropic alpha 2*, Arc: *activity-regulated cytoskeletal-associated protein*, MAPT: *microtubule-associated protein TAU*, MTAP2: *microtubule-associated protein 2*, NTRK2: *neurotrophic tyrosin kinase receptor, TrkB type 2*, TFRC: *transferrin receptor*, CAMK2a: *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha*, SYAP1: *synapse-associated protein 1*. Es mostren els nivells relatius de mRNA vers GAPDH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*). Es mostren les mitjanes i els errors estàndards de 3 experiments independents. Es van utilitzar uns límits de confiança de $\alpha=0.05$. ACTB(1) i (2) són dos jocs de dades independents que es van obtenir per aquesta mostra. PGAM1 (*Phosphoglycerate Mutase 1*) i una segona mesura de GAPDH (2) es van incloure com a controls.

29. L'mRNA de β -actina colocalitza amb la KIS

Reforçant els resultats analitzats en els extrems de cervell, vam observar per PCR quantitativa, que l'mRNA de la de β -actina també es trobava enriquit en una immunoprecipitació (IP) de la KIS fusionada a FLAG en neurones corticals de ratolí infectades amb la construcció lentiviral FLAG-KIS.

El fet que l'mRNA de la β -actina també es trobés moderadament enriquit en aquestes IPs i la distribució de la KIS en neurites és molt semblant a la descrita per l'mRNA de la β -actina, tant en cultius de cèl·lules d'hipocamp com en línies cel·lulars de neuroblastoma (Huttelmaier *et al.* 2005, Tiruchinapalli *et al.* 2003), ens va impulsar a comprovar si la KIS i l'mRNA de la β -actina co-localitzaven a les dendrites. Per això vam analitzar la localització de l'mRNA de la β -actina per FISH (*fluorescent in situ hybridization*) i la localització de l'HA-KIS per immunofluorescència en neurones corticals de ratolí (**Figura 35**). De manera semblant al que succeeix amb ZBP1 (Huttelmaier *et al.* 2005), KIS colocalitza amb l'mRNA de la β -actina a l'extrem i al llarg de les neurites de les neurones corticals.

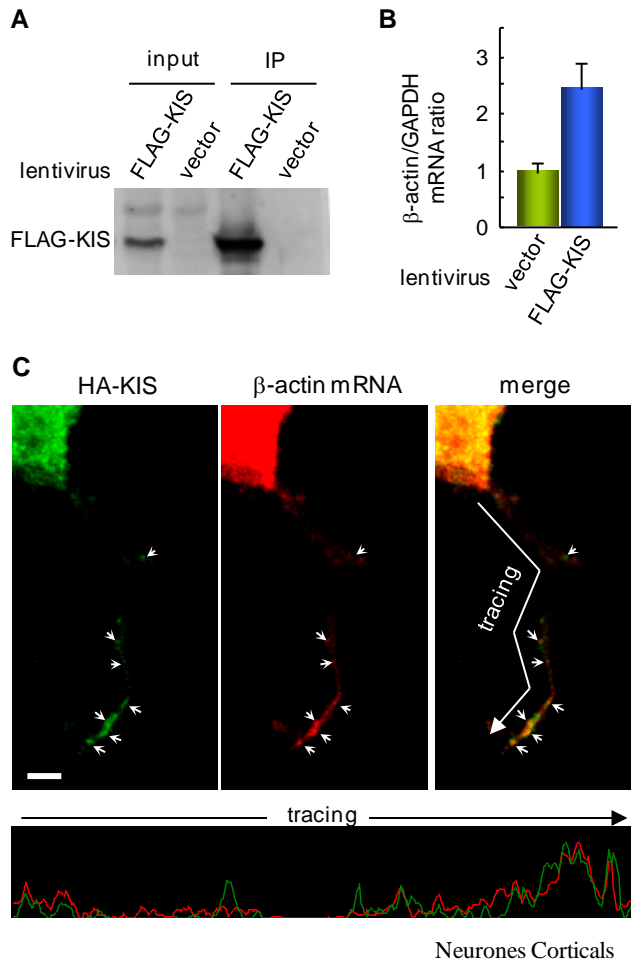


Figura 35. Colocalització i associació de la KIS amb l'mRNA de la β -actina en neurones corticals de ratolí. (A) Immunoprecipitació amb reïna d'agarosa M2 α -FLAG de neurones corticals de ratolí infectades amb la construcció lentiviral FLAG-KIS o amb el vector buit. *Western blot* α -FLAG. (B) La immunoprecipitació de l'apartat A es va utilitzar per determinar la quantitat de mRNA de la β -actina respecte el de la GAPDH en una PCR en temps real. Es mostren les mitjanes i els errors estàndards de 3 experiments independents. Es van utilitzar uns límits de confiança de $\alpha=0.05$. (C) Neurones corticals de ratolí embrionari de 14 dies, diferenciades durant 7 dies i infectades amb el vector lentiviral pDSLhp_UG expressant KIS fusionat a l'epítip HA. Es van analitzar per FISH amb una sonda d'mRNA de β -actina i seguidament es va fer una immunofluorescència amb un anticòs α -HA. La barra equival a 5 μ m. Els perfils de HA-KIS en verd i de l'mRNA de la β -actina en vermell es mostren en valors de fluorescència. Les imatges es van realitzar al microscopi Confocal Olympus FV500 a 60X.

30. La KIS interacciona amb proteïnes importants per la traducció localitzada

La següent qüestió a abordar va ser estudiar quin mecanisme molecular utilitza la KIS per a afectar la traducció localitzada d'mRNAs com el de la β -actina. L'activitat quinasa de la KIS s'ha vist involucrada en l'augment de traducció d'EGFP^{Actb-3'UTR} (veure antecedents). Per això vam hipotetitzar que la KIS podia estar fosforilant a alguna proteïna transcendent per a la traducció. Aquesta fosforilació podia afectar l'activitat d'aquesta proteïna i en conseqüència permetre la inhibició de la traducció durant el transport i la correcte activació de la traducció al seu destí. Amb aquest objectiu vam investigar quines proteïnes implicades en traducció formen part del grànul on es transporta KIS.

Per cercar substrats putatius de la KIS vam estudiar la seqüència de diverses proteïnes fosforilades per la KIS descrites en la literatura (Maucuer *et al.* 2000, Boehm *et al.* 2002, Manceau *et al.* 2008);(Maucuer *et al.* 1997),(Manceau *et al.* 2006). Maucuer i col·laboradors descriuen que la KIS és una serina/treonina quinasa que fosforila substrats serina seguits d'una prolina (Maucuer *et al.* 2000). Vam observar que una possible seqüència consens dels substrats d'aquesta quinasa és una serina/treonina seguida d'una prolina, i a més, a la posició +3 d'aquesta seqüència un aminoàcid hidrofòbic (**Figura 36**). D'aquesta manera vam hipotetitzar una seqüència consens de fosforilació per KIS:

S/T P X Hy	[Hy(LAVIMFWP)]
S P M A	Myelin Basic Protein (Maucuer <i>et al.</i> 1997)
S P G A	Synapsin (Maucuer <i>et al.</i> 2000)
S P S L	p27 (Boehm <i>et al.</i> 2002)
S P P S X P	Splicing Factor 1 (Manceau <i>et al.</i> 2006)

Figura 36. Possible seqüència consens de fosforilació dels substrats de la KIS. En vermell possible seqüència consens de fosforilació de les proteïnes diana de la quinasa KIS. En primer lloc una serina o treonina seguida de prolina i al residu +3 un aminoàcid hidrofòbic. En blau es mostra la seqüència de fosforilació per KIS de les proteïnes ja descrites en la literatura.

La KIS és una proteïna amb un domini UHM (*U2AF homology motif*) a la part C-terminal. Aquest UHM s'ha descrit com un motiu d'interacció

proteïna-proteïna (Kielkopf, Lucke & Green 2004). Aquest motiu es caracteritza per un plegament amb una topologia $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4$, en el qual es troba un motiu RNP1 (motiu homòleg a RiboNucleoProtein 1) a la cadena $\beta 3$ i RNP2 en $\beta 1$ (Maucuer *et al.* 1997). En el *loop* que connecta l' $\alpha 2$ amb la cadena $\beta 4$ es troba el següent motiu conservat: Arg-X-Phe (on X és un aminoàcid qualsevol). En els dominis ULM (*UHM-ligand motifs*), l'aminoàcid més conservat és el triptòfan que s'uneix a la fenilalanina. Normalment davant del triptòfan es troben aminoàcids bàsics (Kielkopf, Lucke & Green 2004). En el cas de la KIS, la presència de càrregues negatives després de la fenilalanina fa que es puguin veure afavorides les interaccions amb els dominis ULM que continguin càrregues positives després del triptòfan (**Figura 37**).

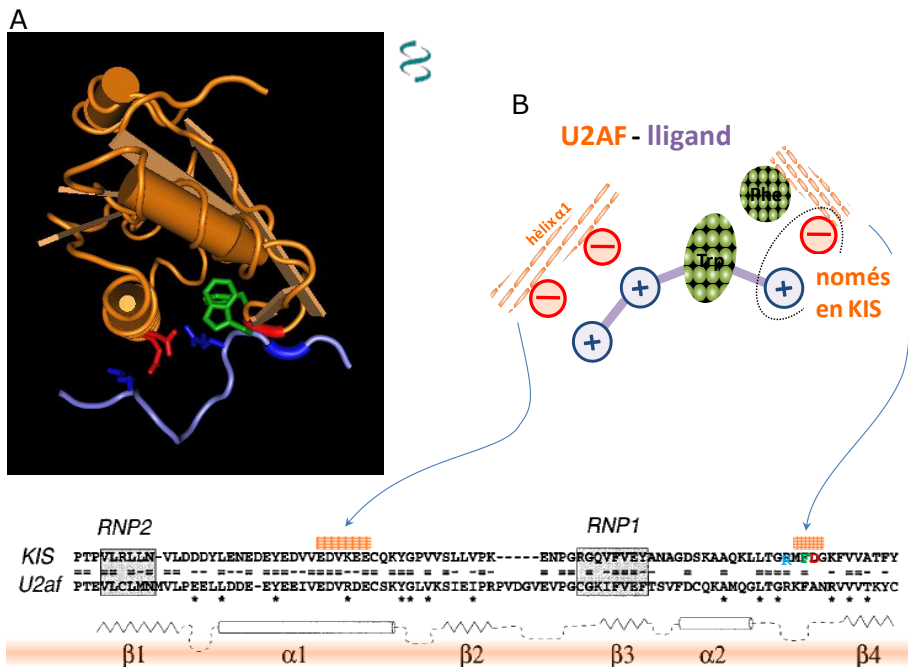


Figura 37. Domini UHM d'interacció proteïna-proteïna. A) Representació tridimensional del domini UHM de la proteïna KIS (taronja) interaccionant amb un lligand (Blau). El vermell representa els residus amb càrregues negatives i el blau fosc les positives. El verd representa la unió del triptòfan i la fenilalanina. B) Representació esquemàtica i seqüència del motiu UHM de KIS interaccionant amb un possible lligand.

Al nostre laboratori s'havia fet prèviament una anàlisi de les possibles proteïnes d'unió a la KIS pel sistema del doble híbrid amb una genoteca embrionària de ratolí i amb una de cervell adult. Dins del gran nombre de

CAPÍTOL II - RESULTATS

proteïnes que es van aïllar, vam analitzar aquelles que segueixen els criteris descrits a la **Taula 2**.

1. Involucrada en traducció (factor de traducció, inhibidor, poliAdenilació, etc).
2. Localitzada en les dendrites (als grànuls d'mRNA)
3. Conté la seqüència d'aa consens de fosforilació per KIS: S/TPXHy (Hy: LAVIMFWP) i (X: qualsevol aa)
4. Conté seqüències d'interacció amb el domini UHM de KIS: ++W/ ++W+ (+: aa de càrrega positiva)

Taula 2. Criteris de cerca de proteïnes regulades per KIS en traducció localitzada.

Vam identificar diverses proteïnes que segueixen alguns dels criteris de la **Taula 2** amb possibilitat d'estar regulades per la proteïna KIS amb un efecte en la traducció d'mRNAs localitzats a la sinapsi: factors de traducció, la proteïna NUFIP1 que interacciona amb el regulador negatiu de la traducció FMRP i dos components ja descrits anteriorment en el laboratori que formaven part del grànul on es troba la KIS: KIF3A i NonO (Cambray *et al.* 2009). També vam incloure a l'estudi la proteïna Borealina que és fosforilada per l'Aurora B i l'Aurora A, la qual aquesta última també fosforila CPEB1, una proteïna responsable de la poliadenilació d'alguns mRNAs i en conseqüència prepara a l'mRNA per la seva traducció (Klann, Dever 2004).

Possibles Proteïnes Diana de KIS en el doble híbrid					
Proteïna	Genoteca	Funció	Localització	Dianes de fosforilació per KIS	Seq. Interacció UHM
eIF2B1	cervell adult	Factor d'inici en la biosíntesi de proteïnes. Factor d'intercanvi de GDP a GTP.	Citoplasmàtica. Grànuls d'RNA	SPSL, TPASA	LKEEHPWVDYTSP
eIF3S6	embrionària	Component del factor d'inici en la síntesi de proteïnes eIF3, associat amb el ribosoma 40S per formar el 43S i reclutar mRNA.	Citoplasmàtica. Grànuls d'RNA	0	SLQQRTWLIHWSL
eEF1A1	embrionària	Factor d'elongació en la síntesi de proteïnes responsable del transport enzimàtic dels aminoacil-tRNAs als ribosomes	Citoplasmàtica. Grànuls d'RNA	0	MPWFKGGWKVTRK
eEF1b2	embrionària	Component del factor d'elongació EF-1 β. Estimula l'intercanvi GDP del EF1α a GTP.	Citoplasmàtica. Grànuls d'RNA	0	CHALRWYNHKSY
NUFIP	cervell adult	Proteïna nuclear i citoplasmàtica que interacciona amb FMRP (Nuclear FMRP-interacting protein 1), regulador negatiu de la traducció.	Nuclear i citoplasmàtica. (Sinaptoneurosome)	TPAP, SPVA, TPAL	PGKHHKWRRGGA PEEIARWRREERR
KIF3A	cervell adult	Kinesina membre 3A. Transport motor per microtúbuls en el cervell	Citoplasmàtica. Grànuls d'RNA	TPVP	KKLKKVWTMLMA
NonO	embrionària	Factor de transcripció/ Splicing.	Nuclear i citoplasmàtica. Grànuls d'RNA	TPPA, TPAP	YEYAMRWKALIE
Borealina	embrionària	Component del complex CPC (<i>Chromosomal passenger complex</i>) regulador de la mitosi, necessari per l'estabilitat del fus mitòtic bipolar.	Nuclear	TPAV, TPGL, TPRF, TPGL, TPAA, SPLA	KALREMNWLDYFA

Taula 3. Proteïnes que interaccionen amb KIS pel sistema de doble híbrid relacionades amb traducció localitzada o grànuls de RNA. Proteïnes trobades a través de l'anàlisi per doble híbrid (2-HY) on la proteïna esquer és KIS i les proteïnes presa són les mostrades en la taula. Es van utilitzar dues llibreries diferents, una genoteca embrionària de ratolí, i una genoteca de cervell de ratolí adult. En vermell es mostra la seqüència consens de fosforilació per KIS trobada a les respectives proteïnes. En verd s'indica el triptòfan de la seqüència d'aminoàcids del possible lligand UHM. En taronja s'indiquen els aminoàcids pròxims al triptòfan carregats positivament.

De totes aquestes proteïnes, la NUFIP1 presenta les millors característiques per ser una possible proteïna regulada per la quinasa KIS. És una proteïna identificada en sinaptoneurosome, que interacciona amb la FMRP (proteïna coneguda com a repressora de la traducció i localitzada en grànuls d'RNA) i que presenta diversos llocs putatius de fosforilació per la KIS i d'interacció amb dominis UHM. A més, NUFIP1 presenta la característica que darrera el triptòfan de la seqüència d'interacció amb un domini UHM trobem un aminoàcid bàsic. Aquesta arginina podria formar un complex més estable amb la KIS a través del domini UHM d'aquesta última ja que al costat de la fenilalanina es troba l'aspàrtic, un aminoàcid amb càrrega negativa.

CAPÍTOL II - RESULTATS

Vam comprovar la interacció de la KIS amb les proteïnes descrites a la **Taula 3** a través d'experiments de co-immunoprecipitació amb reïna d'agarosa M2 α -FLAG en cèl·lules HEK-293T transfectades amb FLAG-KIS o les seves versions truncades o mutada: el KIS K54A (KD, *kinase dead*) sense activitat quinasa (Maucuer *et al.* 1997) (Boehm *et al.* 2002), el fragment N-terminal el qual conté el domini quinasa i el fragment C-terminal el qual conté el domini UHM (**Figura 38**).

En experiments previs del nostre laboratori havíem observat que, el fragment N-terminal de la KIS (amb el domini quinasa), interacciona millor que amb el fragment C-terminal de les proteïnes pertanyents a grànuls d'mRNA com la KIF3A, l'eEF1A1 i la NonO tant per co-immunoprecipitació com a través del sistema de doble híbrid (Cambray *et al.* 2009). Aquesta interacció perd eficiència amb el mutant sense activitat quinasa, suggerint que el domini quinasa actiu de la KIS sobre les citades proteïnes podria ser important per la seva interacció.

Tal com es pot observar a la **Figura 38**, la interacció de l'eIF3S6 i de la NUFIP1 amb les diferents formes de la KIS és més forta amb la part C-terminal de la proteïna de KIS, suggerint una preferència per interaccionar-hi a través del domini UHM. D'altra banda, els factors de traducció i eIF2B1 interaccionen millor amb tota la proteïna de KIS però amb una lleugera preferència per interaccionar a través de l'N-terminal. En el cas de eEF1B2 tot i haver-se observat la seva interacció al doble híbrid, no vam aconseguir comprovar-la *in vivo*. Totes les interaccions es van demostrar de manera endògena amb l'excepció de la NUFIP1 i l'eIF2B1 que van ser sobre-expressades (marcades amb l'epítip HA). També vam demostrar la interacció entre KIS i HA-Borealina (CDCA8) en cèl·lules HEK-293T per co-immunoprecipitació.

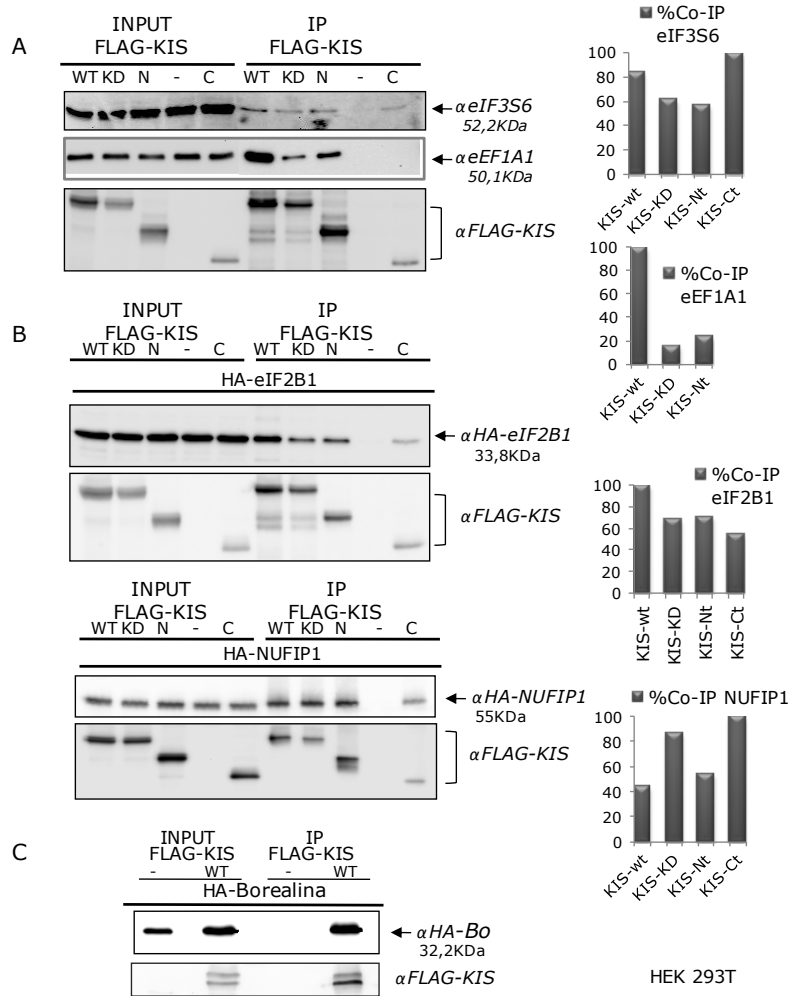


Figura 38. Interacció *in vivo* de la KIS amb possibles proteïnes diana de la KIS. Co-immunoprecipitació de KIS amb les proteïnes endògenes eIF3S6, eEF1A1 i eEF1B2 (A), les sobreexpressades HA-eIF2B1, HA-NUFIP1 (B) i HA-Borealina (C) realitzada amb reina d'agarosa M2 α -FLAG en cèl·lules HEK-293T transfectades durant 24h amb la proteïna sencera i amb les formes truncades de FLAG-KIS: sencera (WT), C-terminal (C), mutant sense activitat quinasa (*Kinase Dead*, KD), N-terminal (N) o FLAG-pCDNA3 (-) com a control negatiu. La immunoprecipitació (IP) es va analitzar per *Western blot* amb anticossos α -FLAG per detectar les diferents formes de KIS, α -eIF3S6, α -eEF1A1, α -eEF1B2 i α -HA. Es mostra el percentatge relatiu d'interacció de la proteïna co-Immunoprecipitada vers els diferents fragments de la proteïna immunoprecipitada KIS.

31. La NUFIP1 i la Borealina es troben en fraccions enriquides en grànuls d'RNA

En estudis previs del nostre grup, es va descriure la presència de la KIS en grànuls d'RNA la qual juntament amb la proteïna NonO i eEF1A1 són transportades per les neurites a través de la proteïna motora KIF3A (Cambray *et al.* 2009). Les proteïnes KIF3A, NonO, eEF1A1, eIF2B1, eIF3S6, eEF1B2 de la **Taula 3** han estat descrites a grànuls de RNA a la literatura (Elvira *et al.* 2006), (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004)(Aronov *et al.* 2002) (Krichevsky, Kosik 2001); a més, el nostre grup va descriure que la KIF3A i la NonO co-immunoprecipitaven al mateix complex que la KIS, es podien purificar en grànuls d'RNA i colocalitzaven *in vivo* amb la KIS en estructures puntejades, concloent que pertanyien al mateix grànul (Tesi Doctoral S.Cambray).

Tal com hem comentat anteriorment, la NUFIP1 presentava la majoria de condicions per poder ser substrat de KIS (**Taula 2**) tot i que fins al moment no havia estat implicada en traducció neuronal localitzada, hi havia estudis que la localitzaven en sinaptoneurosomes (Bardoni *et al.* 2003). Una segona proteïna la qual també vam considerar important a estudiar és la Borealina. Aquesta és una proteïna descrita al nucli. La KIS també és present al nucli i el fet que la Borealina presenti diversos llocs putatius de fosforilació per la KIS i de interacció amb dominis UHM, ens va fer sospitar que la KIS podia estar interaccionant i fosforilant la Borealina com a part implicada en la seva funció nuclear o potser segregant-la i portant-la a les neurites per desenvolupar alguna funció desconeguda de moment.

Vam analitzar la presència de la Borealina i la NUFIP1 en fraccions cel·lulars enriquides en grànuls d'mRNA. Per això vam utilitzar una adaptació del protocol descrit per Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004 per aïllar grànuls d'RNA de cèl·lules corticals i d'hipocamp. Els cultius neuronals d'hipocamp de rata i corticals de ratolí, es van infectar amb lentivirus els quals expressaven la NUFIP1 fusionada a l'epítot HA i es van mantenir durant 7-8 dies en cultiu *in vitro*. Posteriorment es van recollir els extrems i a través de centrifugació diferencial es van descartar en primer lloc els nuclis (P1), després el sistema

de membranes del citoplasma (P2) i finalment es va separar el citosol de la fracció enriquida en grànuls de transport de mRNA, sent aquesta última la que es quedava al *pellet* (P3) (**Figura 39**).

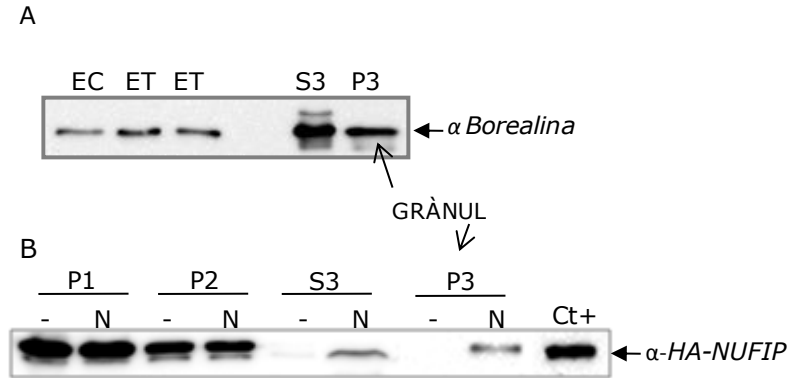


Figura 39. La NUFIP1 i la Borealina es troben en fraccions cel·lulars enriquides en grànuls d'mRNA. (A) Es van purificar grànuls en cèl·lules embrionàries corticals de 14 dies de ratolí mantingudes *in vitro* durant 7 dies. Dels extrems totals es van purificar les fraccions corresponents a grànuls d'RNA (P3) i es van analitzar per *Western blot* amb l'anticòs α -Borealina. Es va utilitzar un extret de cervell de ratolí adult (EC) com a control positiu. (B) En neurones embrionàries hipocampals de 17 dies (E17) de rata mantingudes *in vitro* durant 8 dies i infectades amb el vector lentiviral pDSL que expressa la NUFIP1-HA (N) o sense infectar (-), es van purificar les fraccions corresponents a grànuls d'mRNA (P3) i es va analitzar el resultat per *Western blot* amb l'anticòs α -HA.

Tal com es pot observar en la **Figura 39**, tant la Borealina com la NUFIP1 es troben en grànuls d'RNA. Seguidament, vam comprovar a través d'immunofluorescència si podíem detectar la presència de la NUFIP1 a les neurites i aquestes presentaven un patró puntejat similar als grànuls de transport d'mRNA de la KIS. Per aquest motiu vam analitzar la presència de la NUFIP1 a les neurites infectades amb el vector lentiviral HA-NUFIP1 de neurones hipocampals de rata diferenciades *in vitro* durant 7-8 dies i ho vam comparar amb la distribució que s'observa amb la KIS. Tal com veiem en la **Figura 40**, la NUFIP1 és present tant al nucli com a les neurites amb un patró puntejat similar a la KIS.

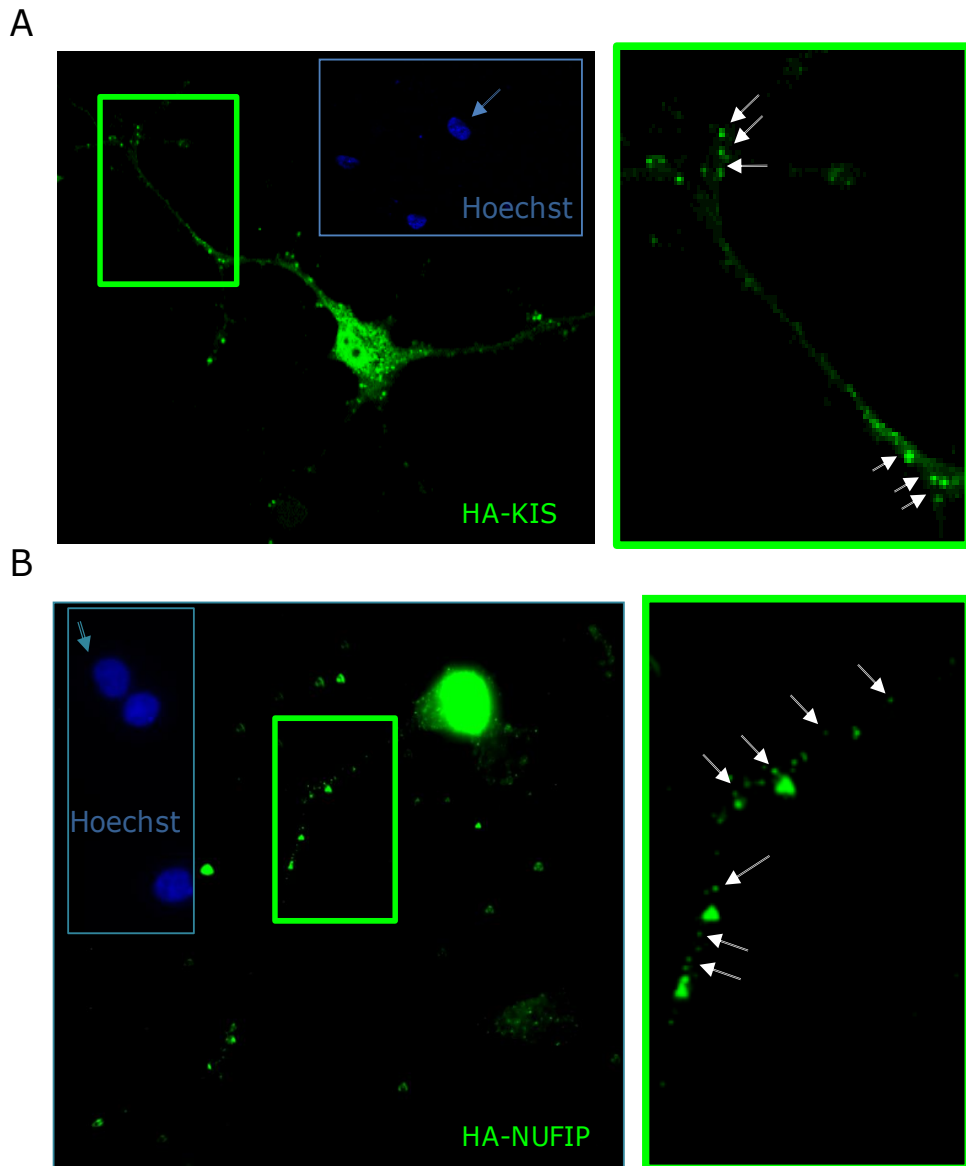


Figura 40. Distribució de la KIS i de la NUFIP1 en neurones diferenciades. Neurones hipocàmpals de rata postnatal d'un dia, diferenciades durant 8 DIVs i infectades amb els lentivirus procedents de la construcció (A) pDSL HA-KIS o (B) pDSL HA-NUFIP1. Es mostra la immunofluorescència realitzada amb l'anticòs α -HA (3F10). Com a control es van utilitzar cèl·lules no infectades. Els nuclis es van marcar amb Hoechst. Les fletxes mostren la localització puntejada de les proteïnes. Les imatges es van realitzar al microscopi Confocal Olympus FV500 a 60X (A) o al microscopi de fluorescència Olympus BX51a 60X (B).

D'aquesta manera podem dir que la NUFIP1 i la Borealina són dues noves proteïnes trobades en grànuls d'RNA, la NUFIP1 a més, presenta un

patró d'expressió similar al que presenta la KIS i ja que totes dues proteïnes interaccionen amb la KIS, possiblement aquestes proteïnes es trobin dins del mateix grànul de transport d'RNA.

32. Proteïnes substrats de la quinasa KIS

Vam analitzar si la quinasa KIS estava fosforilant a algun dels seus interactors que també són components del grànul de transport. Per tal d'analitzar quins podien ser els substrats de la KIS vam realitzar assaigs quinasa *in vitro*. Entre les proteïnes que interaccionaven amb la KIS, vam seleccionar les que contenien la seqüència consens de fosforilació per la KIS (Taula 2). Segons aquest criteri, les proteïnes eIF2B1, NUFIP1, Borealina, KIF3A i NonO eren possibles substrats de fosforilació per la KIS (Taula 3).

Vam produir la KIS i el seu mutant sense activitat quinasa fusionades a l'epítot GST (26kDa) en bacteris *E.Coli BL21*. També vam produir de manera heteròloga les proteïnes senceres o fragments d'aquestes que contenen la seqüència consens de fosforilació per la KIS. Vam purificar les proteïnes amb reïna de Glutatió-Sepharose 4B (*GE-Healthcare*). Amb les proteïnes purificades vam dur a terme assaigs quinasa. En aquest experiment (**Figura 42**) vam observar que la KIS fosforila la NUFIP1 en el seu domini C-terminal, de l'aminoàcid del 337 al 443aa coincidint amb la localització de la tercera seqüència consens que presenta la proteïna, però no la N-terminal (12-122aa) on es troben dues seqüències consens més (**Figura 41**).



Figura 41. Esquema de la seqüència de la NUFIP1. Anàlisi de la seqüència de la NUFIP1. Es mostra l'N-terminal i el C-terminal purificats i utilitzats pels assaigs *in vitro* amb les dianes de fosforilació per la KIS marcades en vermell.

També vam observar que KIS també pot fosforilar la part C-terminal (98-232) de la Borealina, precisament on hi ha les dianes consens de fosforilació per la KIS. Vam observar també que la KIS fosforila la proteïna

CAPÍTOL II - RESULTATS

sencera de NonO, però quan vam intentar delimitar la zona de fosforilació utilitzant la part C-terminal de la NonO entre els aminoàcids 367-471, justament on havíem trobat la seqüència consens, no vam poder detectar la fosforilació (dades no mostrades), entenent que no només aquells pèptids són importants per la correcte fosforilació, sinó juntament amb una altra zona de la proteïna o potser inclús tota sencera són necessaris per la correcte interacció de la KIS i la NonO i per la seva fosforilació. Els assaigs quinasa amb les proteïnes eIF2B1 i KIF3A ens van donar un resultat negatiu, tant amb les proteïnes expressant només la part corresponent on es localitza la seqüència consens (en ambdós cassos la C-terminal) (**Figura 42**), com quan vam intentar l'assaig quinasa amb tota la proteïna.

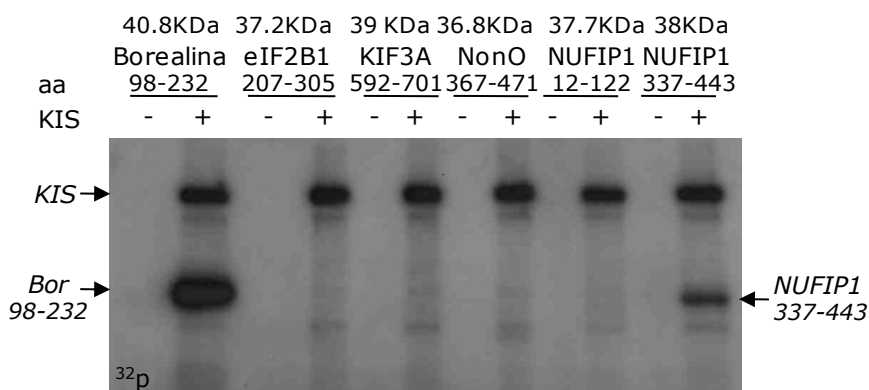


Figura 42. Fosforilació *in vitro* de possibles substrats de la KIS. Les proteïnes KIS-Wt (72KDa), Borealina de l'aa 98 al 232 la part c-terminal de eIF2B1(207-305), la part C-t de KIF3A (592-701), la part C-t de NonO (367-471), l'amino terminal de la NUFIP1 (12-122aa) i la part C-t de NUFIP1 (337-443aa), totes elles fusionades a GST i recombinants es van expressar en *Escherichia coli* BL21. Es van purificar amb reïna de glutatió-sepharose. Amb les proteïnes descrites es van dur a terme assaigs quinasa amb fòsfor (ATP) radioactiu durant 20 minuts a 30°C i sotmetre a electroforesi SDS-PAGE.

33. La KIS i la NUFIP1 són importants per mantenir els nivells d'mRNAs transportats en grànuls

Per saber quin efecte podia tenir la manca o disminució de la KIS i la NUFIP1 en un cultiu neuronal, vam inhibir la seva expressió mitjançant lentivirus amb l'shRNA contra la KIS o la NUFIP1 (**Figura 43**). Per això vam

infectar neurones hipocampals de rata d'un dia postnatal a *dia 0 in vitro* (DIV) durant 24h i vàrem mantenir el cultiu durant 8 dies. El percentatge d'inhibició de KIS i de NUFIP1 en 4 experiments diferents variaven entre el 96,3 i el 99% pel cas de KIS i entre el 92 i el 93% pel cas de la NUFIP1 (**Figura 43B**). Vam processar les mostres per extreure'n l'RNA i analitzar mitjançant PCR quantitativa alguns mRNAs importants per la plasticitat sinàptica o/i que havíem demostrat que coimmunoprecipitaven amb la KIS, com la MAPT, l'Arc i la SAPAP2 (Korb, Finkbeiner 2011, Bramham *et al.* 2010)(Zalfa *et al.* 2007, De Rubeis, Bagni 2010, De Rubeis, Bagni 2011)(Schutt *et al.* 2009)(Zukin, Richter & Bagni 2009, Usardi *et al.* 2011, Dewachter *et al.* 2008),(Atlas *et al.* 2007).

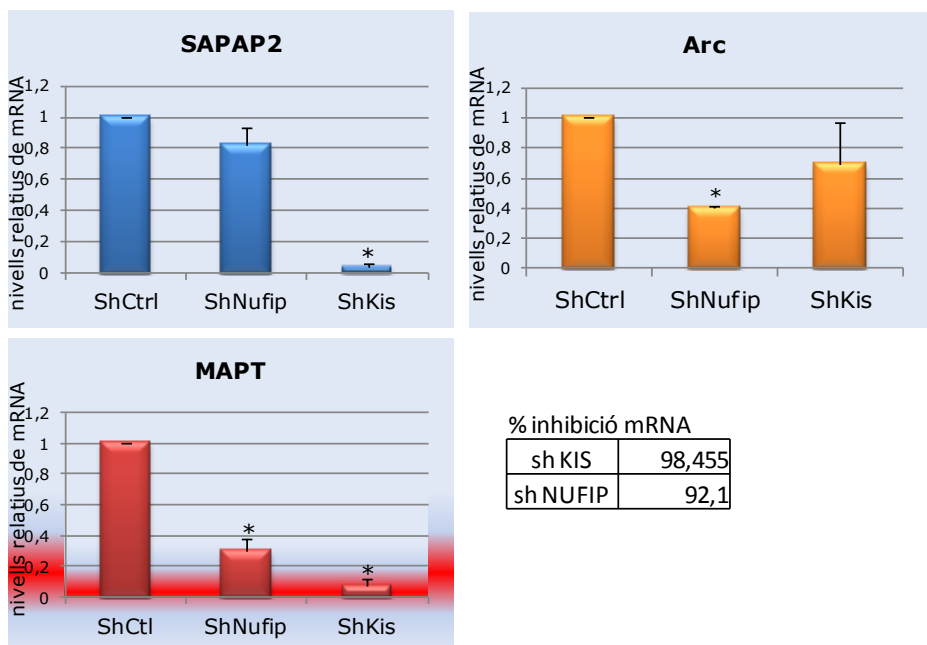


Figura 43. La inhibició de l'expressió de la KIS i/o de la NUFIP1 produeix variacions en els nivells dels mRNAs de SAPAP2, Arc i MAPT. Cèl·lules hipocampals de rata postnatsals d'un dia es van infectar amb virus amb shRNA de dues seqüències diferents de KIS: S2 i S3 (shKIS2, shKIS3), i amb un ShRNA Control (shCT). Les cèl·lules es van infectar durant 24h i el cultiu es va mantenir durant 8 dies *in vitro*. S'observa un *Western blot* amb l'anticòs contra KIS. Com a control positiu es van utilitzar cèl·lules corticals de rata infectades amb lentivirus de KIS (46KDa). (B) Neurones d'hipocamp de rata postnatsals d'un dia cultivades 8 dies *in vitro* infectades amb els shRNA de NUFIP1, KIS o control durant 24h. Vam extreure'n l'RNA i vam analitzar els nivells de RNA de SAPAP2, Arc i MAPT per PCR en temps real. Els valors es van relativitzar als nivells de RNA de GAPDH Es mostra la mitjana i els errors estàndars

CAPÍTOL II - RESULTATS

de quatre experiments independents. Les diferències significatives ($\alpha=0,05$) respecte el control es mostren amb un asterisc.

A la **Figura 43** podem observar que quan inhibim l'expressió de la KIS, els nivells de l'mRNA del SAPAP2 disminueixen significativament. La SAPAP és una proteïna de la Densitat Postsinàptica la qual podria jugar un paper important en la organització de les sinapsis en cèl·lules neuronals (Takeuchi *et al.* 1997). La SAPAP2 és una proteïna bastida que forma un complex amb les altres SAPAPs 1-4 i PSD-95, l'expressió de les quals està associada a la FMRP (Luedi *et al.* 2007),(Narayanan *et al.* 2008, Schutt *et al.* 2009). L'mRNA de MAPT disminueix més d'un 90% i l'mRNA d'Arc mostra una lleugera tendència a reduir-se però sense que la diferència sigui significativa.

En el cas de la NUFIP1, amb la seva inhibició no veiem una disminució significativa dels nivells de l'mRNA del SAPAP2 però si que el veiem pels de la MAPT i l'Arc. Vam repetir els experiments en cultius corticals de rata seguint el mateix procediment descrit pels cultius hipocampals, però en aquest cas, tot i observar una bona inhibició en l'mRNA de la KIS o de la NUFIP1, no observàvem cap disminució dels mRNAs analitzats (SAPAP2, MAPT i Arc). Aquests resultats ens indiquen que tant la NUFIP1 com la KIS tenen un paper important en l'expressió d'alguns mRNAs com els de SAPAP2, MAPT i Arc en cultius hipocampals però no en neurones corticals.

34. Anàlisi de l'autofosforilació de la KIS

Per tal d'aprofundir en l'estudi de l'activitat quinasa de la KIS i donat que la KIS s'autofosforila (Maucuer *et al.* 2000), vam cercar la seqüència consens de fosforilació per la KIS dins la seva pròpia seqüència.

La KIS presenta tres vegades la seqüència consens de fosforilació per ella mateixa en la serina 101, la serina 301 i la treonina 320 (**Figura 44A**).

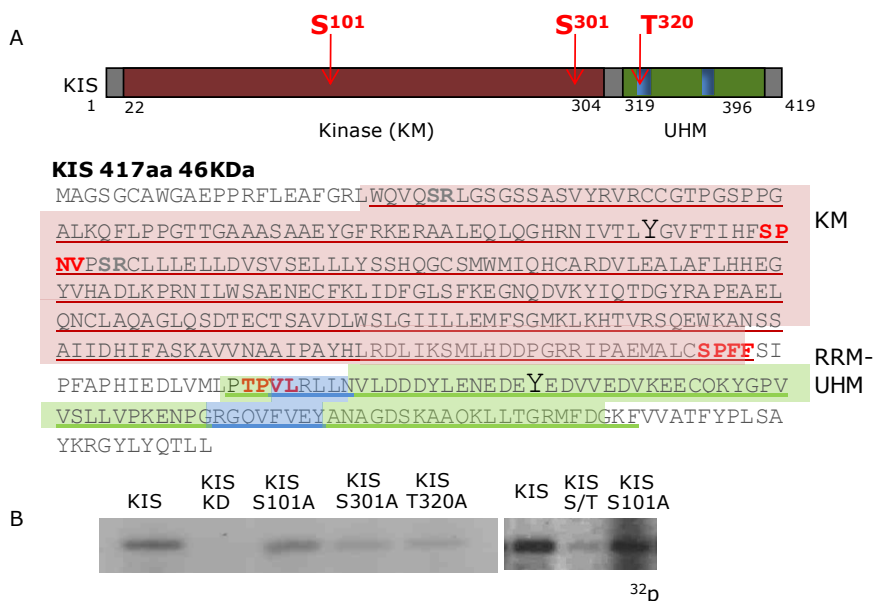


Figura 44. Anàlisi de l'autofosforilació de la KIS. (A) Anàlisi de la seqüència de la KIS. KM (*kinase motif*) representa el motiu quinasa, tot el domini N-terminal desde l'aminoàcid 22 al 304. En la part C-terminal de l'aminoàcid 319 al 407, es troba el motiu UHM (*U2AF Homology Motif*), al qual hi ha dos dominis conservats descrits com a RNPs (marcats amb blau). Les serines o treonines marcades amb vermell S101, S301, T320 tenen rellevància per la seva autofosforilació. (B) Les proteïnes KIS-Wt, KIS KD, KIS amb les mutacions S101A, S301A i la T320A (72KDa), totes fusionades a GST es van expressar en *E.Coli* BL21 i purificar amb reïna de glutatió-sepharose (*GE-Healthcare*). La radiografia mostra a través d'un assaig quinasa *in vitro* l'autofosforilació de la quinasa KIS en les seves diferents formes.

Per analitzar l'autofosforilació de la KIS, vam fer mutacions puntuals a la seqüència de la KIS a les serines 101, 301 i la treonina 320 mutant-les a alanina. El mutant sense activitat quinasa no es pot autofosforilar. Vam purificar les proteïnes en *E.Coli* i vam fer assaigs quinasa *in vitro* amb elles. Tal com es pot veure a la **Figura 44B**, la mutació S101A pràcticament no redueix l'autofosforilació de la KIS. En canvi, la mutació S301A o T320A la redueixen en un 80%. El mutant sense activitat quinasa no s'autofosforila. La proteïna resultant de la doble mutació S301A i T320A (KIS S/T) redueix pràcticament tota l'autofosforilació. Vam estudiar l'efecte de la doble mutació en dos dels substrats que la KIS fosforila: Borealina i p27, queda reflectit en la **Figura 45**, on la KIS S/T a part de perdre la capacitat d'autofosforilar-se perd la capacitat de fosforilar els seus substrats. Aquest resultat ens confirmava que l'autofosforilació de la KIS és necessària per la seva activitat quinasa.

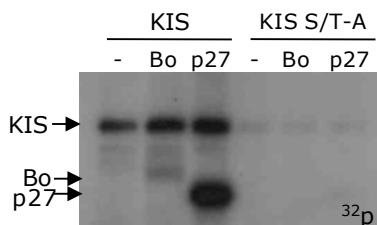


Figura 45. Efecte de la inhibició de l'autofosforilació de la KIS en la fosforilació dels seus substrats. Es van purificar les proteïnes fusionades a GST KIS-Wt, KIS S301/T320-A (S/T-A) (72KDa), Borealina (Bo) (57.3KDa) i p27(53KDa) i es van dur a terme assaigs quinasa entre la quinasa KIS o la seva forma S/T mutada i els diferents substrats. Es mostra la radiografia resultant.

Per saber si l'autofosforilació es produeix entre dues molècules de KIS o de manera intramolecular, vam dur a terme un assaig quinasa *in vitro* utilitzant la KIS fusionada a histidines (la qual s'havia purificat de forma desnaturalitzada i en conseqüència havia perdut l'activitat quinasa) i la KIS fusionada a GST (la qual conservava la seva activitat quinasa). En aquest experiment (**Figura 46**), vam observar que la GST-KIS no era capaç de fosforilar la HIS-KIS. Aquests resultats ens suggereixen que l'autofosforilació s'esdevé de manera intramolecular.

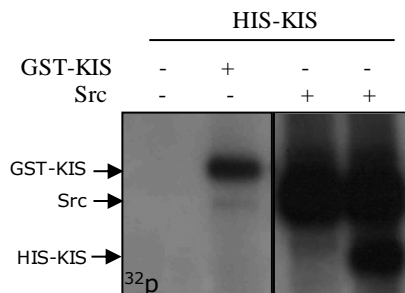


Figura 46. La KIS desnaturalitzada no es pot fosforilar per la GST-KIS. Les proteïnes KIS fusionades a histidines (HIS) (46KDa), GST (72KDa) o Src (60KDa) purificades en condicions denaturants o natives respectivament es van sotmetre a assaigs quinasa *in vitro* amb ATP marcat radioactivament (^{32}P). Es mostren les radiografies resultants.

Ens vam preguntar si el fet que la KIS amb les mutacions en els residus importants per l'autofosforilació no pogués fosforilar als seus substrats era degut a la pèrdua de la seva activitat com a quinasa, o a què

aquells residus poguessin ser importants per la interacció amb les proteïnes diana. Per aquest motiu vam co-immunoprecipitar altre cop algunes de les proteïnes que ja havíem demostrat que interaccionaven amb la KIS, però utilitzant la KIS amb les mutacions en els residus importants per l'autofosforilació. Vam fer una co-immunoprecipitació de la KIS amb les proteïnes endògenes NonO i eEF1A1. Vam observar que aquestes perden la interacció amb la forma de la KIS que presenta la T320A, mentre que la mantenen amb la S301A, mostrant que la T320, la treonina d'autofosforilació present en el domini UHM, és en part responsable de la seva interacció amb la KIS.

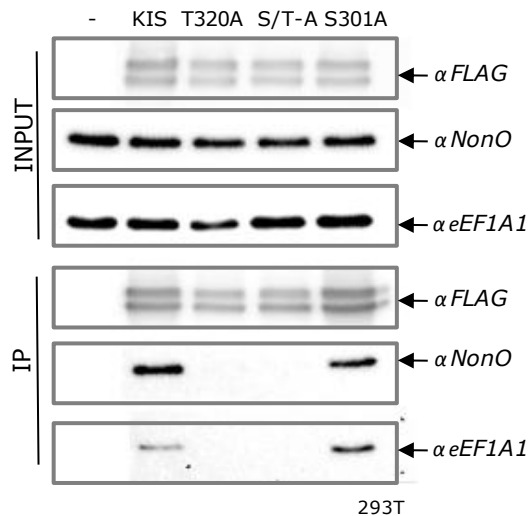


Figura 47. Co-immunoprecipitació de la FLAG-KIS mutada en els residus importants per la seva autofosforilació amb alguns dels seus interactors. En cèl·lules HEK-293T es van transfectar la FLAG-KIS o les seves formes mutades puntualment en T320A, S301A. A les 24h es van recollir les cèl·lules i es va immunoprecipitar la KIS i els seus mutants amb reina α -FLAG. Es va analitzar la coimmunoprecipitació de les proteïnes NonO i eEF1A1 per *Western blot*.

35. Regulació de la KIS: Anàlisi de la fosforilació de la KIS per la quinasa Src

El nostre següent objectiu va ser estudiar la regulació de la KIS. Vam utilitzar diverses *webs* de predicció de possibles llocs de fosforilació (Netphos 2.0, Kinasephos, Netphosk i scansite). Segons aquestes bases de dades la KIS podria ser una proteïna diana de la quinasa Src en les tirosines 93 i 340 (**Figura 48**).

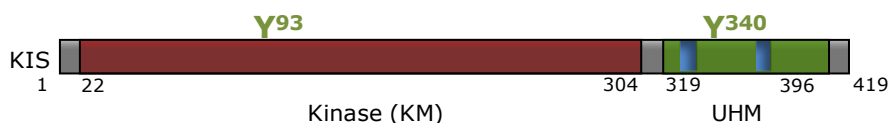


Figura 48. Anàlisi de la seqüència de la KIS i possibles seqüències de fosforilació per la Src. KM representa el motiu quinasa, aborda tot el domini amino desde l'aa 18 al 305. En la part C-terminal de l'aa 319 al 407, es troba el motiu UHM (*U2AF Homology Motif*), amb al qual hi ha dos dominis conservats descrits com a RNPs (marcats amb blau). Les tirosines marcades en verd Y⁹³, Y³⁴⁰ són llocs de possible fosforilació per la Src.

Ens vam interessar per la quinasa Src ja que se l'ha descrit com a reguladora de la traducció d'mRNAs. Durant el transport dels mRNAs per les neurites, la traducció està inhibida. La traducció de l'mRNA de β -actina en llocs actius de polimerització d'actina (com els cons de creixement dels axons en desenvolupament) és necessària per la migració cel·lular (Zhang *et al.* 2001). Per evitar la seva traducció prematura, la proteïna ZBP1 repressora s'uneix a l'RNA de la β -actina a través del domini *Zipcode*. Un cop l'mRNA arriba al seu destí, la Src fosforila la ZBP1 en una tirosina fora del domini d'unió a RNA, la qual s'ha demostrat que debilita la unió de la ZBP1 amb l'mRNA i afavoreix així la traducció de la β -actina (**Figura 34, 35**) (Sasaki *et al.* 2010),(Huttelmaier *et al.* 2005). La KIS interacciona amb l'mRNA de la β -actina. Com que està descrit que a través d'un senyal donat per Src s'indueix la traducció d'aquest mRNA quan està unit a ZBP1, vam hipotetitzar que la Src podria interaccionar amb la KIS o amb el seu complex granular i produir un efecte desinhibidor de la traducció dels mRNAs que acompanyen.

Vam dur a terme diversos assaigs quinasa per comprovar si la proteïna Src fosforilava la KIS i quina era la funció d'aquesta fosforilació. Per tal de veure la fosforilació de Src sobre KIS evitant observar l'autofosforilació de la KIS vam utilitzar el mutant KIS^{KD} (sense activitat quinasa) fusionat a GST. Vam realitzar un assaig quinasa *in vitro* amb la HIS-Src (Sigma, 60KDa) i vàries formes de la proteïna KIS (KIS, KIS^{KD}, KIS^{KD}Y93F o KIS^{KD}Y340F), fusionades a l'epítot GST. Tal com podem observar en la **Figura 49** la Src s'autofosforila (Boulet, Fagard & Fischer 1987)(Sasaki *et al.* 2010, Huttelmaier *et al.* 2005) i és capaç de fosforilar la KIS tant a la forma wt com la que no té activitat quinasa (GST-KIS^{KD}). Per veure un efecte directe de la Src en la KIS, vam utilitzar el mutant sense activitat quinasa que contenia les citades tirosines mutades a fenilalanina. Les mutacions de la KIS^{KD}Y93F i la KIS^{KD}Y340F reduïen notablement la fosforilació de la KIS per la Src, especialment la mutació de la tirosina 340. Així doncs, els residus de la KIS Y93 i Y340 són importants per la fosforilació *in vitro* de la KIS per la Src.

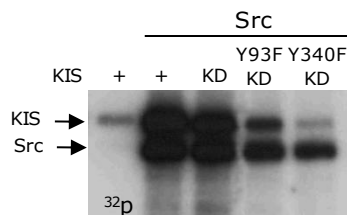


Figura 49. Fosforilació de la KIS per la quinasa Src. (A) Les proteïnes KIS, KIS^{KD}, KIS^{KD}Y93F o KIS^{KD}Y340F fusionades a GST (72KDa) purificades en condicions natives es van sotmetre a assaigs quinasa amb ATP marcat radioactivament (³²P) en presència o absència de la Src (60KDa). Es mostren les radiografies resultants.

Per saber si aquestes fosforilacions eren importants per l'activitat quinasa de la KIS *in vitro*, vàrem procedir a incubar els seus substrats amb la KIS, la Src o amb totes dues quinases alhora. La Src fosforila tots els substrats que vam provar independentment de la KIS fins i tot la KIF3A C-terminal (un substrat que en les nostres condicions d'assaig quinasa, la KIS no pot fosforilar). En general la intensitat de les fosforilacions augmentava quan incubàvem els substrats amb les dues quinases alhora suggerint que l'acció de les dues quinases se suma (**Figura 50 i 51**).

CAPÍTOL II - RESULTATS

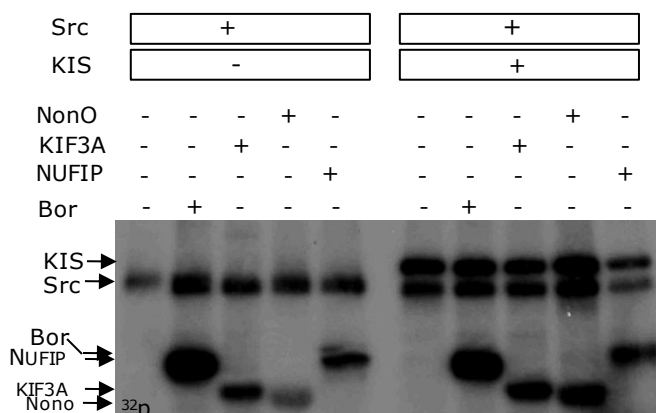


Figura 50. Fosforilació de la KIS per la quinasa Src i els seus efectes en les proteïnes diana de la KIS. Les proteïnes KIS (72KDa), NonO-Ct (36.8KDa), KIF3A-ct (39.04KDa), NUFIP1-Ct (38.02KDa) i Borealina-Ct (40.8KDa) es van sotmetre a assaigs quinasa amb ATP marcat radioactivament (^{32}P) en presència o absència de Src (Sigma, 60KDa) a 30°C durant 20 min amb ATP- ^{32}P . Es va utilitzar 1µg de substrat, 200ng de la quinasa KIS i 72ng de la quinasa Src, tant si es van utilitzar conjuntament com independent. Es mostra la radiografies resultant.

Per estudiar si aquest augment de fosforilació en els substrats es deu a la suma de les dues quinases o per contra, la Src fosforila la KIS fent-la més activa, vam procedir a fer assaigs quinasa *in vitro* amb una prèvia incubació entre la Src i la KIS amb ATP no radioactiu. Un cop fet, vam inhibir la quinasa Src amb un inhibidor específic de la Src, PP1 (calbiochem) per tal d'evitar la fosforilació directa de la Src sobre els substrats de la KIS. Vam procedir a fer l'assaig *in vitro* amb un dels substrats on veiem millor la fosforilació *in vitro* com és la Borealina.

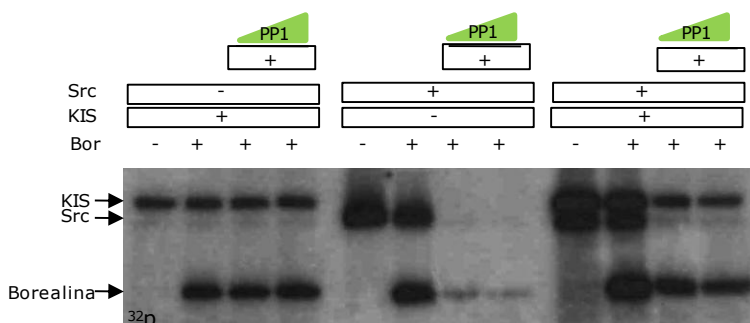


Figura 51. Efectes de la quinasa Src en l'activitat quinasa de KIS sobre Borealina. Es va fer una pre-incubació de la KIS (72KDa) amb la Src (Sigma,60KDa) i ATP no radioactiu durant 20 min a 30°C. Seguidament es va aturar la reacció (a 4°C) i es va afegir l'inhibidor de Src, PPI, a 20µM o 40µM. Seguidament la proteïna Borealina-

ct (40.8KDa) fusionada a GST es va sotmetre a assaigs quinasa a 30°C durant 20 min amb ATP-³²P. Es mostren les radiografies resultants.

Tal com es pot observar a la **Figura 50 i 51**, l'inhibidor de la Src no afecta l'activitat de la KIS, però sí l'activitat quinasa de Src. No obstant, la preincubació de la KIS amb la Src no implica un augment en la fosforilació del substrat Borelina (**Figura 51**) en presència de l'inhibidor de la Src.

Així doncs, la presència de la Src augmenta la fosforilació de la KIS i la dels seus substrats, però aquest augment no és degut a una major activitat de la KIS en presència de la Src, sinó a la suma de les fosforilacions de la KIS i la Src sobre els substrats.

DISCUSSIÓ

La KIS és una serina/treonina quinasa identificada inicialment com una proteïna d'interacció amb l'*stathmina*. La seva fosforilació per part de la KIS en regula la seva degradació evitant un excés de tubulina desestabilitzada durant la migració i la progressió del cicle cel·lular (Maucuer *et al.* 2000). També s'ha descrit la fosforilació de la p27^{KIP1} per la KIS, la qual controla la seva localització cel·lular, indicant que la KIS és un regulador important en la progressió del cicle cel·lular (Boehm *et al.* 2002). El domini quinasa de la KIS no mostra homologia amb altres quinases, però el seu domini C-terminal en presenta un 42% amb el factor d'*splicing* U2AF65. També s'ha demostrat que la KIS fosforila el factor d'assemblatge a l'*spliceosoma* SF1 (Manceau *et al.* 2006). El patró d'expressió de la quinasa KIS (a nivell d'RNA) suggereix un paper important en el desenvolupament del sistema nerviós i en el cervell adult (Bieche *et al.* 2003). En un **estudi previ del nostre** grup s'ha demostrat la localització de la KIS en grànuls de transport d'RNA a les neurites, on també hi trobem altres proteïnes com la quinesina KIF3A, el factor d'*splicing* NonO, el seu interactor PSF i el factor d'elongació de la traducció eEF1A1 (Cambray *et al.* 2009). També es demostra que la KIS pot estar ajudant a la traducció dels mRNAs que acompanya, ja que KIS augmenta la traducció del reporter GFP fusionat al 3'UTR de l'mRNA de la β -actina, mentre que la forma mutada de la KIS sense activitat quinasa no ho pot fer (Cambray *et al.* 2009).

Amb tots aquests antecedents vam proposar com a **hipòtesi de treball**, que la quinasa KIS amb l'ajut d'altres proteïnes presents al seu grànul de transport d'RNA, participa a la traducció de l'mRNA transportat a les sinapsis a través de la fosforilació d'algunes de les proteïnes que componen el grànul.

36. La Borealina i la NUFIP1, nous components de grànuls de transport d'mRNA que interaccionen amb la KIS.

Als grànuls de transport d'mRNA trobem principalment proteïnes d'unió a mRNA, proteïnes motores (quinesines, dineïnes), mRNA, components de la maquinària de la traducció (factors de traducció, RNA ribosomal, etc) i proteïnes reguladores de la traducció (FMRP, ZBP1...) (Kiebler, Bassell 2006). Algunes de les proteïnes que hem identificat que interaccionen amb la KIS són factors de traducció: l'eIF2B1, l'eIF3S6 i l'eEF1A1, els quals ja havien estat descrits anteriorment en grànuls de transport d'RNA (Aronov *et al.* 2002)(Krichevsky, Kosik 2001) (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004, Elvira *et al.* 2006). Altres proteïnes que interaccionen amb la KIS (Dades de la Tesi doctoral de Serafí Cambray) les quals també s'havia demostrat la seva presència en grànuls de transport d'RNA són la KIF3A, la NonO i el seu dímer PSF.

Cada vegada hi ha més estudis que suggereixen que l'assemblatge dels mRNPs citoplasmàtics succeeix al nucli(Giorgi, Moore 2007, Czaplinski, Singer 2006). En són exemple les proteïnes que pertanyen a grànuls d'mRNA com l'eIF4AIII de l'EJC (*Exon Junction Complex*) (Giorgi *et al.* 2007), la proteïna ZBP1, que s'uneix al *zipcode* del 3'UTR de la β -actina, inhibint la seva traducció (Huttelmaier *et al.* 2005), la família hnRNPA/B o les proteïnes que es transporten del nucli i al citoplasma com la STAUFEN i la FMRP (Kiebler *et al.* 2005, Lai, Sakkas & Huang 2006).

Tant en resultats del nostre laboratori, com en d'altres autors (Maucuer *et al.* 2000, Boehm *et al.* 2002), es mostra que la KIS es localitza tant a les neurites(Cambray *et al.* 2009), com també al nucli on desenvolupa una funció important per la correcta progressió del cicle cel·lular i una funció en *splicing*. La NonO i la PSF són dues proteïnes relacionades amb *splicing* (Emili *et al.* 2002, Dong *et al.* 2007, Kaneko *et al.* 2007) i amb reparació del dany al DNA (Salton *et al.* 2010, Li *et al.* 2009). Tant la NonO com la PSF, a part de localitzar-se al nucli, també s'han identificat en grànuls d'RNA, on interaccionen i colocalitzen amb la KIS (Cambray *et al.* 2009). La NonO i la PSF podrien estar reclutades al nucli on farien la seva funció en *splicing* i

després ser exportades al citoplasma amb la KIS desenvolupant un altre tipus de funció fins ara desconeguda.

El primer objectiu va ser identificar altres components dels grànul d'RNA que interaccionin amb la KIS. La NUFIP1, fins ara, ha estat descrita com una proteïna majoritàriament nuclear (Kaur, Bekier & Taylor 2010, Gassmann *et al.* 2004) (Bardoni, Schenck & Mandel 1999). La NUFIP1 és una proteïna d'unió a RNA que, a més, s'uneix a la FMRP podent cooperar amb ella en l'exportació nucleocitoplasmàtica i en la localització dels mRNAs als llocs postsinàptics (Bardoni *et al.* 2003). Un bon indicatiu que la NUFIP1 es podria trobar als grànuls de transport d'mRNA és que s'ha identificat prop de les sinapsis actives formant part dels sinaptoneurosomes, associant-se amb ribosomes. Aquest fet suggereix una funció addicional al control de la traducció localitzada similar a la que fa la FMRP (Bardoni *et al.* 2003). En el nostre treball hem demostrat la colocalització *in vivo* de la KIS amb la NUFIP1, així com la presència d'aquesta en la fracció de grànuls de transport d'RNA. També hem observat la seva localització tant al nucli com a les neurites de neurones d'hipocamp, amb un patró d'expressió puntejat similar al de la proteïna KIS. A més demostrem també que la KIS fosforila NUFIP1. Aquests resultats ens suggereixen que la NUFIP1 es pot transportar juntament amb la KIS al mateix grànul de transport d'mRNA i podria ser que la seva unió a l'RNP es realitzi al nucli (Bardoni *et al.* 2003). La NUFIP1 és una proteïna que presenta dues possibles seqüències d'interacció amb l'UHM de la KIS, la qual just darrera del triptòfan presenta aminoàcids carregats positivament, els quals podrien reforçar la unió de la KIS amb la NUFIP1.

La Borealina és una proteïna descrita fins al moment com una proteïna nuclear que pertany al complex CPC (*chromosomal passenger complex*) com la quinasa Aurora B, l'INCENP o la Survivin regulant la segregació dels cromosomes, la citocinesi i donant estabilitat al fus mitòtic bipolar (Kaur, Bekier & Taylor 2010) (Gassmann *et al.* 2004). La Borealina és una proteïna que a la seva seqüència mostra elements de possible interacció amb el domini UHM de la KIS així com possibles llocs diana de fosforilació per aquesta quinasa. En aquesta Tesi hem demostrat que la Borealina interacciona amb la KIS *in vivo*, la qual fosforila i a més s'ha identificat en grànuls d'RNA purificats. Aquest fet suggereix que Borealina no només es localitza al nucli sinó que es podria transportar juntament amb la

resta de components granulars per les neurites. Tot i que no podem assegurar que aquestes unions esdevinguin dins i fora del nucli o només dins el nucli, s'ha observat que Borealina és fosforilada tant per l'Aurora quinasa B com per l'Aurora quinasa A (Tien *et al.* 2004), sent aquesta última una quinasa descrita en grànuls d'mRNA la qual és responsable de la desinhibició de la traducció d'alguns mRNAs (Richter 2010, Huang *et al.* 2002).

37. La KIS co-localitza amb mRNAs implicats en plasticitat sinàptica

Recentment s'han publicat unes dades que suggereixen que els mRNAs transportats rarament es localitzen al mateix RNP dendrític (Mikl, Vendra & Kiebler 2011). Això permetria una regulació dels mRNAs transportats a cada sinapsi de manera selectiva i independent, i en conseqüència, contribuiria a la modificació i a la plasticitat específica de cada una (Mikl, Vendra & Kiebler 2011). Als nostres estudis hem identificat que la KIS interacciona amb complexos els quals contenen diversos mRNAs prèviament identificats en grànuls de transport i que juguen un paper important en la plasticitat sinàptica i la LTP (*Long Term Potentiation*) (Giorgi, Moore 2007) (Santos, Comprido & Duarte 2010): ACTB, β -actina; GRIA1, GRIA2, receptor de glutamat ionotòpic α 1 i 2; Arc, *Activity-regulated cytoskeletal-associated protein*; **MAPT**: microtubule-associated protein TAU; **MTAP2**: microtubule-associated protein; NTRK2, TrkB; CamKII α , *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha*; SYAP1, *Synapse-associated protein*; (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004, Krichevsky, Kosik 2001, Elvira *et al.* 2006)(Huttelmaier *et al.* 2005) (Giorgi *et al.* 2007, Giorgi, Moore 2007). Un d'aquests mRNAs amb els quals la KIS interacciona és el de la β -actina, amb el qual també demostrem que la KIS hi colocalitza per FISH mostrant un patró similar al descrit a la literatura (Zhang, Singer & Bassell 1999). Aquest resultat ens indica que la KIS es pot transportar als mateixos mRNP que β -actina, fet que suggereix que la KIS és una proteïna important en la composició dels grànuls de transport dels citats mRNAs, que probablement és present en diferents grànuls i que la KIS podria exercir un rol important en el control de la plasticitat sinàptica.

38. La KIS i la NUFIP1 són importants per l'expressió d'alguns mRNAs transportats al grànul

La KIS podria ser una peça clau dels grànuls d'mRNA amb els que es transporta per les neurites fins a les sinapsis. La KIS ajuda a la traducció localitzada de la proteïna GFP portada fins a les neurites al estar fusionada al 3'UTR de la β -actina (Cambray *et al.* 2009). Aquest increment de traducció necessita la funció quinasa de la KIS, però el mecanisme exacte amb el qual ho fa no el coneixem encara. Inhibint la producció de proteïna KIS amb shRNAs hem observat que la quantitat del mRNA de la SAPAP2 i de MAPT queda reduïda de manera significativa, i l'mRNA d'Arc mostra una lleugera reducció. Una situació semblant succeeix quan inhibim els nivells de la NUFIP1, però amb els mRNAs d'Arc i de MAPT, els quals la seva reducció és significativa. Que la baixada de l'expressió de la KIS i/o NUFIP1 redueixi les quantitats d'mRNA dels gens mencionats es podria interpretar com un efecte transcripcional de la KIS sobre aquests mRNAs al nucli. De totes maneres, tot i que no podem descartar aquesta hipòtesi, el fet que els mRNAs que es redueixen siguin importants per la plasticitat sinàptica i que s'han trobat localitzats a les sinapsis i es transporten en RNPs, no és estrany suggerir que la manca de la KIS i/o la NUFIP1 podria produir un dèficit important en la formació del grànul de transport dels mRNAs anomenats, o la degradació prematura dels mRNAs. Aquesta hipòtesi estaria en acord amb la idea que es descriu en (Giorgi *et al.* 2007) on explica que si un mRNA silenciats preparat pel seu transport, perdés un factor inhibitori important durant el transport i la seva traducció es tornés activa, la maquinària de degradació de l'mRNA eliminaria ràpidament aquest mRNA prevenint la síntesi proteica al temps i al lloc no desitjats.

No se sap quin sistema d'inhibició s'utilitza als grànuls de transport on trobem la KIS per l'mRNA transportat, ja que no sabem si la KIS és una proteïna comú en tots els grànuls d'RNA o només hi és present en alguns. En la mateixa línia ens sorgeix el dubte amb la NUFIP1, una proteïna que interacciona amb la FMRP, la qual està descrita com una repressora de la traducció. La FRMP s'uneix a diferents mRNAs com CaMKII α , PSD-95, Arc o Map1b, i amb l'ajuda de CYFIP (una proteïna que uneix eIF4E) i/o l'RNA BC1 bloqueja la unió de eIF4E amb eIF4G evitant l'inici de la traducció (Napoli *et*

al. 2008) (Zalfa *et al.* 2007). Se sap que el BDNF és un estimulador de la síntesi proteica a la sinapsi però no se sap quin és el mecanisme que utilitza per augmentar aquesta síntesi. L'mRNA inhibida, un cop arriba a la sinapsi se separa de la FMRP-CYFIP a través d'un estímul rebut pel TrkB activat pel BDNF o pels receptors de mGluR i s'activa la traducció (De Rubeis, Bagni 2011). Una possibilitat podria ser que s'activés la quinasa Src així com passa en el cas de la ZBP1, sent un mecanisme comú en diferents estratègies de des-repressió traduccional. La NUFIP1 podria actuar de forma similar a la CYFIP1, com una proteïna d'unió a l'RNA que interacciona amb la FMRP i per les seves característiques podríem pensar que podria participar en un rol similar a la FMRP. Els nostres resultats donen suport a aquesta hipòtesi ja que la inhibició de NUFIP1 fa baixar significativament els nivells de l'mRNA d'*Arc*, mRNA que interacciona amb FMRP (Niere, Wilkerson & Huber 2012).

39. El residu T320 de la quinasa KIS és important per la seva autofosforilació i per la fosforilació dels seus substrats

Segons Maucuer *et al.* 2000, Manceau *et al.* 2006, la KIS fosforila residus serina seguits per prolina a la posició +1, evitant tenir un residu bàsic a la posició +3, fet que la diferencia p.ex. de les cdk's. Comparant les seqüències dels substrats de la KIS ja coneguts, en aquest treball hem proposat una seqüència consens de fosforilació basant-nos en les observacions del laboratori de Sobel i afegint en la posició +3 un residu hidrofòbic. A través d'aquesta aproximació, vam fer una anàlisi dels diferents substrats amb la seqüència putativa de fosforilació, detectant possibles substrats de la KIS els quals vam comprovar a través d'assaigs quinasa *in vitro*. Vam trobar que la KIS fosforila la NonO, la Borealina i la NUFIP1. Tot i que la KIF3A i l'eIF2B1 contenen possibles seqüències de fosforilació per la KIS, no hem pogut detectar fosforilació en assaigs quinasa *in vitro*.

Per tal d'aprofundir en l'estudi de l'activitat quinasa de la KIS i donat que la KIS s'autofosforila (Maucuer *et al.* 2000), vam cercar la seqüència consens de fosforilació per la KIS dins la seva pròpia seqüència i mitjançant

assaigs quinasa *in vitro* vam poder identificar residus importants per la seva autofosforilació, com la serina 301 i la treonina 320. El mutant T320A de la KIS (amb menor autofosforilació) també presenta una menor activitat quinasa pels seus substrats, entenent que la seva capacitat de fosforilar-se i de fosforilar els seus substrats depèn del seu estat d'auto-fosforilació sent consistent amb els resultats de (Maucuer *et al.* 1997, Maucuer *et al.* 2000).

A més quan analitzem la interacció endògena de la NonO o l'eEF1A1 amb el mutant de la KIS T320A observem que aquests perden la capacitat d'interaccionar-hi. Això indica que la conformació que la KIS adopta quan té aquest residu mutat afecta a la interacció amb les citades proteïnes, suggerint que l'estat de fosforilació de la KIS pot afectar a la interacció amb altres proteïnes. Aquest resultat també ens indica que la KIS que perd la capacitat de fosforilar els seus substrats perquè no pot interaccionar directa o indirectament amb ells. Seria interessant saber si aquesta pèrdua d'interacció és deguda a la conformació de la KIS quan no està autofosforilada o en canvi es deu a un canvi conformacional degut a la mutació a alanina en el residu T320.

40. Efecte de les fosforilacions de la Src a les proteïnes del grànul on es troba la KIS

La Src és una tirosina quinasa que conté un domini SH2 a través del qual reconeix tirosines fosforilables als seus substrats (Ma, Huang 2002, Thomas, Brugge 1997). La família de les quinases Src (SFKs) estan involucrades en proliferació, diferenciació i plasticitat neuronal, incloent potenciació a llarg termini (LTP), aprenentatge i memòria (Katsura *et al.* 2006). El BDNF és activador del receptor TrkB el qual també ha estat relacionat amb un increment de L-LTP i de la memòria (Minichiello 2009). El TrkB pot activar les SFKs i aquestes últimes alhora poden promoure l'activació del TrkB (Huang, McNamara 2010) (Bromann, Korkaya & Courtneidge 2004). D'altra banda s'ha relacionat la Src amb la desrepressió traduccional dels mRNAs silenciats durant el seu transport. Quan l'mRNA de la β -actina arriba a la seva correcta localització al con de creixement, la Src rep una senyal a través de BDNF/TrkB o la unió de Netrina/DCC que l'activa i

CAPÍTOL II - DISCUSSIÓ

fosforila la ZBP1 desreprimint la seva traducció (Huttelmaier *et al.* 2005); (Sasaki *et al.* 2010) (Welshhans, Bassell 2011a). La família Src no-receptora tirosina quinasa Fyn també ha estat implicada en l'augment de la traducció de l'mRNA de la MBP (*Myelin Basic Protein*) on l'activació en oligodendrocits de Fyn, permet la fosforilació de la proteïna de grànuls de transport d'RNA hnRNPA2, augmentant la traducció de l'mRNA de la MBP que l'acompanya (White *et al.* 2012).

En aquest treball mostrem que la Src és capaç de fosforilar la KIS *in vitro* i aquesta fosforilació es redueix considerablement quan utilitzem el mutant de la KIS amb la tirosina 340 mutada a fenilalanina. La fosforilació de la KIS per part de la Src *in vitro* no afecta ni l'autofosforilació de la KIS ni en disminueix l'activitat quinasa que la KIS té sobre els seus substrats. La Src pot fosforilar els substrats de la KIS: la Borealina, la NonO i la NUFIP1 a més de la KIF3A. A més, a l'afegir les dues quinases als substrats de la KIS observem un lleuger increment a la seva fosforilació, indicant que les fosforilacions per part de les dues quinases se sumen.

Tot i que la Src és capaç de fosforilar la KIS, a les nostres condicions d'assaigs quinasa *in vitro*, no hem pogut detectar un augment de l'activitat quinasa de la KIS deguda a la fosforilació per la Src. Una possibilitat seria que la KIS s'activés per la Src *in vivo* però que en la forma heteròloga en què la purifiquem, la KIS ja es trobés fosforilada en *E.Coli* i per això no poguéssim detectar aquest augment als nostres experiments. Seria interessant saber si utilitzant una fosfatassa per desfosforilar la KIS purificada veiem un efecte en la fosforilació de la KIS per la Src.

No hem pogut comprovar si el fet que la Src estigui fosforilant a la KIS i els seus substrats produeix un augment en la traducció d'alguns mRNAs que interaccionen amb la KIS. Però el fet que la Src fosforili la KIF3A podria suggerir aquesta direcció, ja que es podria hipotetitzar que aquesta fosforilació actués de manera similar com ho fa la KIF17, la Mint1 i la seva fosforilació per CaMKII α (Ally, Jolly & Gelfand 2008) . La CamKII α fosforila la KIF17 i deixa anar la seva càrrega prop de la sinapsi. En el nostre cas podríem pensar que la fosforilació de la KIF3A per Src podria fer deixar la càrrega de l'mRNP del microtúbul i la resta del grànul és dirigit a través de

fibres d'actina als botons sinàptics on es desinhibits la traducció dels mRNAs que acompanya.

41. Col·laboren la KIS i la Src a la traducció d'mRNAs sinàptics?

Les dades presentades fins ara ens permeten conèixer millor la composició d'alguns grànuls d'mRNA i ens apropen a un millor coneixement d'aquests a la traducció localitzada. La KIS presenta elements en dos dels tres sistemes de repressió de la traducció dels mRNAs més descrits en la literatura **a)** ZBP1-mRNA de la β -actina desreprimint per la Src; **b)** CPEB1-Maskin/PARN, desinhibit per l'AuroraA i **c)** La FMRP-CYFIP desinhibit per BDNF o l'activació de mGluR (De Rubeis, Bagni 2011, Welshhans, Bassell 2011, Swanger, Bassell 2011). Per això proposem que la KIS juntament amb la NUFIP1 són proteïnes clau pel transport dels mRNAs i la traducció a la sinapsi de la β -actina, del SAPAP2, del MAPT i d'Arc, proposant com a hipotètic model per la traducció sinàptica que, (**Figura 52**) quan el grànul que conté la KIS rep un estímul sinàptic el qual activa la quinasa Src. Aquesta fosforila la KIS i la KIF3A i alliberaria la càrrega del grànul del microtúbul permetent que el grànul arribi fins al botó sinàptic. La NUFIP1 podria ser l'encarregada de reprimir la traducció d'alguns dels citats mRNAs durant el seu transport, i quan arribés a la seva correcta localització quedaria fosforilada per la KIS amb l'ajut d'altres quinases com la Src, desunint-se de l'mRNA i promovent la seva traducció. Un cop es desfés el grànul es podrien desreprimir els mRNAs d'aquest i començar la seva traducció necessària per la plasticitat sinàptica.

Figura 52. Model hipotètic de regulació traduccional a la sinapsi. A) Representació esquemàtica de 2 grànuls de transport d'mRNA al qual hi trobem la KIS i algun dels seus substrats. B) A través d'un estímul sinàptic el qual activa els receptors (TrkB, NMDAR, mGluR) s'activen proteïnes com l'Aurora quinasa A o la Src. La Src fosforilant la KIF3A podria ser el detonant de la disgregació de la càrrega del grànul, el qual podria anar fins al botó sinàptic a través dels filaments d'actina presents al coll sinàptic. C) Un cop els elements del grànul arriben al botó sinàptic, les quinases Src, AuroraKA i KIS podrien fosforilar els seus substrats activant la traducció dels mRNAs que l'acompanyen.

En resum, **en aquest treball hem contribuït a** la caracterització dels grànuls de transport de mRNA on es troba KIS: 1) identificant altres proteïnes que també hi interaccionen, 2) algunes de les quals són substrats de KIS com la Borealina, la NonO, la NUFIP1, 3) També hem trobat que la tirosina quinasa Src fosforila la KIS i els seus substrats *in vitro*. 4) A més, hem identificat mRNAs que es tradueixen a la sinapsi els quals són importants per l'activitat sinàptica que interaccionen amb la KIS alguns dels quals, com Arc o MAPT es redueixen significativament quan inhibim la KIS o la NUFIP1 com també passa amb l'mRNA de SAPAP2.

CONCLUSIONS

42. CONCLUSIONS

- 1- La MAP3K MLK2 interacciona amb la bHLH E47 fosforila als residus serina/treonina del segon domini d'activació (AD2) d'E47.
- 2- La fosforilació al motiu LH d'E47 per MLK2 inhibeix la seva activitat transcripcional sobre el promotor del TrkB.
- 3- La inhibició de la MLK2 produeix un augment dels nivells d'mRNA de TrkB, establint un mecanisme molecular a través del qual E47 és un punt d'unió entre una via de mort i una via de supervivència.
- 4- La KIS interacciona amb la NUFIP1, la Borealina i els factors de traducció eEF1A1, eIF2B1 i eIF3S6, totes elles aïllades en un fraccionament bioquímic de grànuls de transport d'mRNA a les neurites.
- 5- La NUFIP1 mostra una distribució entre el nucli i les neurites hipocampals de forma puntejada amb un patró similar al que presenta la KIS. A més, les proteïnes KIS i NUFIP1 són essencials per l'expressió dels mRNAs de MAPT, SAPAP2 i Arc.
- 6- La KIS interacciona amb mRNAs identificats en partícules RNP de transport i importants per la plasticitat sinàptica. A més KIS també colocalitza amb L'RNA de la β -actina en neurones corticals diferenciades.
- 7- La KIS necessita els residus S301 i T320 per la seva autofosforilació per poder fosforilar els seus substrats NUFIP1, Borealina, NonO.
- 8- La quinasa Src fosforila la KIS *in vitro* al residu Y340, a més de fosforilar la quinesina KIF3A i també als substrats de la KIS. El conjunt de les quinases KIS-Src augmenten la fosforilació dels substrats de la quinasa KIS.

MATERIALS I MÈTODES

44. Cultius cel·lulars

En aquesta Tesi hem utilitzat vàries línies cel·lulars i diferents tipus de cultius primaris els quals es mostren a la taula següent:

Línies	ESPÈCIE	ORIGEN	FENOTIP
HEK-293T	<i>H.Sapiens</i>	Ronyó embrionari Humà	Línea cel·lular immortalitzada de ronyó.
SH-SY5Y	<i>H.Sapiens</i>	Neuroblastoma humà	Neurones
GP2-293T	<i>H.Sapiens</i>	HEK-293T	Línea modificada HEK-293T integrant els gens d'empaquetament retrovirals <i>gag</i> i <i>pol</i>
Primaris	ESPÈCIE		FENOTIP
Corticals	<i>R.Norvegicus</i> Sprague-Dawley	còrtex	Precursors neuronal/neurones diferenciades
Hipocampals	<i>R.Norvegicus</i> Sprague-Dawley	hipocamp	Neurones
Granulars	<i>R.Norvegicus</i> Sprague-Dawley	cerebel	Neurones
MEFs	<i>M.musculus</i>	Teixit conjuntiu embrionari de ratolí	Fibroblasts embrionaris
MEFs KO JNK	<i>M.musculus</i>	Teixit conjuntiu embrionari de ratolí KO en JNK	Fibroblasts embrionaris deficients en JNK

Totes les cèl·lules es van incubar a 37°C en una atmosfera humida al 5% de CO₂.

44.1. Medis utilitzats

Les **línies** cel·lulars i els **MEFs** es van mantenir en medi de *Dulbecco's modified Eagle medium* (D-MEM; Gibco) suplementat al 10% amb sèrum fetal Boví (FCS; Gibco), estreptomicina (20U/ml) i penicil·lina (20µg/ml). Els Primaris (**Corticals**, **Hipocampals**) es van mantenir en medi

MATERIALS I MÈTODES

Neurobasal A (Gibco) suplementat amb estreptomina (20U/ml), penicil·lina (20µg/ml), B-27 i Glutamax (Gibco). Mentre que les **granulars** de cerebel es van mantenir amb medi bàsic d'*Eagle* (*BEM, Basal Eagle Medium*)(Gibco) suplementat amb 25mM de KCl, 10% de sèrum dialitzat fetal boví, 2mM de glutamina, estreptomina (20U/ml) i penicil·lina (20µg/ml).

44.2. Manteniment cel·lular

44.2.1. HEK-293T, GP2-293T, MEFs, SHSY-5Y

Les cèl·lules **HEK-293T** són una línia cel·lular humana de cèl·lules de ronyó embrionàries i són un bon model per sobre-expressar. Per mantenir les cèl·lules es cultiven en medi D-MEM amb un 10% de sèrum. Es divideixen cada 2-3 dies quan arriben al 80% de confluència. Per dividir-les, primer s'aspira el medi de la placa i es renta amb PBS 1x (tampó fosfat salí) escalfat a 37°C per eliminar tot el sèrum. Les cèl·lules es desenganxen afegint-hicel 25% de tripsina-EDTA prèviament escalfada a 37°C durant 1-2 minuts inactivant-la passant aquest temps amb sèrum que es present en el medi de cultiu. Les cèl·lules es recullen en 10ml i es centrifuguen a 220xg durant 5 minuts. Seguidament es ressuspèn el *pellet* en 1 ml de medi DMEM 10% de sèrum i un cop ben homogeneïtzat es porta fins a 10ml amb el medi mencionat. Es fa el comptatge cel·lular amb l'ajut de la càmera de Neubauer. Seguidament es planta normalment 25000cèl·lules/cm² en les plaques desitjades.

Les cèl·lules **GP2-293T** són una línia modificada de les HEK-293T integrant els gens d'empaquetament retrovirals *gag* i *pol*. El seu manteniment és igual que el de les HEK-293T. Els **MEFs** i els MEFs *KO* en *JNK*^{1/2} es van obtenir del laboratori de Encinas M. Es divideixen seguint el mateix procediment que les HEK-293T tenint en compte que són més difícils de ressuspèndre un cop els hem centrifugat i que la seva densitat de plantació és de 17000 cèl·lules/cm².

La línia cel·lular **SH-SY5Y** és derivada d'un neuroblastoma humà, té la capacitat d'estar proliferant en condicions natives, o pot diferenciar-se amb àcid retinoic (RA) en cèl·lules neuronals estrictament dependents de BDNF, mostrant moltes de les característiques que trobem als cultius neuronals primaris (**Figura 53**) (Encinas *et al.* 2000). Són una eina molt útil per

treballar en condicions més fisiològicament semblants als cultius primaris neuronals però amb la característica que al ser una línia cel·lular immortalitzada són més fàcils de manipular. Per induir l'aturada del cicle cel·lular i la diferenciació de les SHSY-5Y en fenotip neuronal, es va afegir all-*trans*-retinoic acid (RA, Sigma) a una concentració final de 10µM durant 5 dies. Posteriorment es va retirar l'RA, es va substituir el medi D-MEM 10% per D-MEM sense sèrum, fent prèviament 3 rentats, i es va afegir BDNF (*Brain Derived Neurotrophic factor*, PreproTech) a 100ng/ml, per afavorir i mantenir la maduració neuronal.

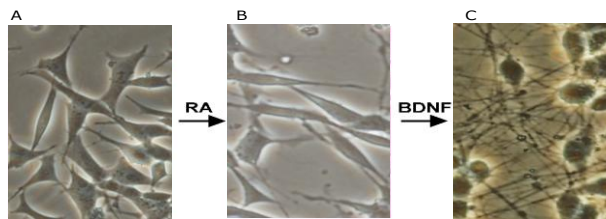


Figura 53. Diferenciació neuronal de cèl·lules de neuroblastoma SH-SY5Y. Cèl·lules SH-SY5Y en proliferació (A) es van tractar amb 10µM d'àcid retinoic (RA) durant 5 dies (B) i posteriorment se les va deprivar de sèrum i es va afegir al medi 100ng/ml de BDNF (C) (Brain-Derived Neurotrophic Factor).

En la majoria dels nostres experiments hem treballat amb les cèl·lules SH-SY5Y fins el primer estadi de diferenciació sense arribar a afegir BDNF, degut a que en un treball previ del nostre laboratori (Liu *et al.* 2004), s'havia demostrat que les cèl·lules SH-SY5Y expressen suficient TrkB actiu en aquesta fase, sent suficientment pels nostres objectius. El manteniment d'aquestes cèl·lules és fa de manera similar a les HEK-293T, dividint-se cada 4 dies i després del comptatge plantant-ne a una concentració de 50000 cèl·lules/cm².

44.2.2. Cultius primaris neuronals

Pels cultius primaris neuronals es van utilitzar plaques tractades amb poly-D-lisina (Sigma) a 500µg/ml diluït en tampó Bòric-Borat (372mM àcid bòric i 37,7 mM tetraborat sòdic pH 8,3) que durant les 4h abans de plantar-hi el cultiu es van cobrir amb una capa de laminina (Invitrogen) a 3-4µg/ml preparada amb medi Neurobasal (Gibco) a 37°C. Tot el material de dissecció s'esterilitzava en cada ús amb etanol al 70% i es flamejava per evitar toxicitats per part de l'alcohol al cultiu.

MATERIALS I MÈTODES

Els cultius primaris de **cerebel de rata** es van obtenir a partir de rates postnats de dia 7 seguint les indicacions de (Wang, Paden & Johnson 2005). Les cèl·lules es dissocien amb 1mg/ml de tripsina durant 15 minuts a 37°C. Posteriorment es trituren mecànicament i es planten en plaques tractades amb poli-D-lisina (Sigma) a una densitat de $3 \cdot 10^5$ cèl·lules/ml. Al cap d'un dia *in vitro* es va afegir 3.3 µg/ml d'afidicolina (inhibidor de la proliferació) per reduir el nombre de cèl·lules no neuronals.

Els cultius primaris de **neurones d'hipocamp** de rata es van obtenir aïllant l'hipocamp de rates post-natals de dia 1-2, o embrionaris de 16-18 dies seguint el protocol de (Huang, Richter 2007). Un cop obtinguts, i seguint un protocol basat en (Kaech, Banker 2006) es van digerir amb tripsina al 2,5% (Sigma) en medi HBSS (Gibco) durant 20 minuts a 37°C. Passat aquest temps es van afegir 0,25µg/µl de DNaseI i es va deixar actuar durant 30 seg, temps en que degradarà el DNA que s'hagi pogut alliberar d'alguna cèl·lula lisada. Seguidament es van fer tres rentats per precipitació amb medi D-MEM al 10% de sèrum per eliminar qualsevol resta de tripsina i de DNase i vam ajustar el volum a 1ml. Vam homogeneïtzar el cultiu passant-lo per una pipeta pasteur de vidre polida al foc amb un diàmetre ample per reduir els trossos més grans durant unes 10 vegades màxim. A continuació es van triturar molt a poc a poc amb una pipeta pasteur polida amb un diàmetre més petit per dissociar les cèl·lules i per evitar danyar-les màxim unes 10 vegades. Les cèl·lules es van deixar en suspensió durant 2 minuts moment en que es va transferir el sobrenadant en un tub nou. Les cèl·lules es van comptar segons la seva viabilitat tenyint les que estaven malmeses amb *Trypan blue*. La densitat en què es planten les cèl·lules és entre $100-200 \cdot 10^3$ /ml en plaques tractades prèviament amb poli-D-lisina i laminina. Un cop les cèl·lules estaven plantades (~2h) es va substituir el medi D-MEM 10% per Neurobasal (Gibco) suplementat amb B27 50X i Glutamax 100X (Gibco). Un quart del medi es canviava cada 4 dies per medi nou. En cas de què el cultiu s'infectés amb lentivirus, aquesta infecció es va fer a temps 0, és a dir un cop les cèl·lules s'havien adherit i se substituïa el medi D-MEM10% per Neurobasal. El cultiu es va mantenir *in-vitro* entre 8 i 14 dies segons l'experiment.

Els cultius **neuronals de còrtex** de rata es van obtenir basant-nos en el protocol de (Kaech, Banker 2006). Un cop s'aïllaven els dos hemisferis

lliures de meninges, es duia a terme una disgregació mecànica tallant el cultiu en quadrats d'aproximadament 1-2mm². Posteriorment es va dur a terme una disgregació enzimàtica amb tripsina al 2,5% (Sigma) i DNAsaI al 1% en medi HBSS (Gibco) incubant-ho a 37°C durant 10 min barrejant-ho esporàdicament. Les cèl·lules es van triturar passant-les consecutivament per pipetes de diàmetres cada vegada més petit (10ml, 5ml, pipeta pasteur polida al foc de diàmetre gran) tornant a incubar les cèl·lules 5 min a 37°C entre cada pas fins que tot el cultiu es veu homogeneïtzat. A continuació es van centrifugar les cèl·lules a 120xg per eliminar restes enzimàtiques i cèl·lules lisades descartant el sobrenadant. El *pellet* es va ressuspèndre en 10ml de D-MEM al 10%. Les cèl·lules es van comptar i plantar seguint els mateixos passos que en les cèl·lules hipocampals, amb una densitat 300·10³/ml. La infecció amb lentivirals és realitzava a dia 0 en el moment en que les cèl·lules estaven ja adherides. El cultiu es va mantenir *in-vitro* entre 8 i 14 dies segons l'experiment.

44.3. Congelació i descongelació cel·lular

Per la congelació de les línies cel·lulars i dels MEFs, aquestes es divideixen seguint el procediment descrit anteriorment fins a la centrifugació. El *pellet* obtingut es ressuspèn en 1ml de medi de congelació (90% sèrum fetal boví + 10% DMSO) i s'aliquota en vials de 1ml a una concentració de 2·10⁶ cèl·lules/ml. Els vials es guarden un mínim de 24h a -80°C i després es conserven en nitrogen líquid.

Per la descongelació, primerament es treuen els vials del contenidor de N₂ líquid i ràpidament es descongelen en un bany a 37°C. Ajustant el volum fins a 10ml amb medi sense sèrum en un tub cònic es centrifuguen 5 minuts a 220xg. Un cop obtenim el *pellet*, s'hi afegeix D-MEM amb 10% de sèrum i es planten en una placa de 60mm tenint en compte que un petit percentatge de les cèl·lules moren en aquest procés.

45. Construccions plasmídiques

Tots els DNAs plasmídics els hem obtingut utilitzant els reactius i les instruccions de QIAGEN MAXI KIT o SIGMA MINIPREP KIT aïllats de

MATERIALS I MÈTODES

Escherichia coli DH5 α . La qualitat del DNA es va comprovar per electroforesi en gels d'agarosa tenyits amb bromur d'etidi. La concentració del DNA es va obtenir quantificant-lo amb l'espectrofotòmetre NonoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

Per obtenir noves construccions plasmídiques s'han seguit els protocols descrits en *Current Protocols Biology* (Ausbel *et al.* 1987) per les digestions de DNA amb enzims de restricció, lligació i transformació. Per la purificació del DNA es va utilitzar QIAquick Gel Extraction KIT o bé QIAquick PCR purification KIT (Qiagen) seguint les seves pròpies indicacions. A la **Taula 4** es mostren els plàsmids usats.

NOM	VECTOR	DESCRIPCIÓ	REF.
pcDNA3FLAG5'	CMVp-3FLAG	Vector pcDNA3 amb promotor CMV i 3 epitops FLAG en el 5' del lloc de multiclonatge	cedit per Joaquim Egea
pGL3-control	pGL3 control vector	Vector amb el promotor SV40 i seqüències d'augment per una expressió forta del gen de la luciferassa	Promega
pGEX-KG	pGEX-2T derivative	Vector d'expressió que conté el promotor Tac, l'epítip GST i un lloc de tall per thrombin	Neus Agell
pNBM 470	pCDNA3-6HIS-3HA-MCS	Expressa sota el promotor de CMV. Conté 3 epitops HA i 6 Histidines	Miquel Segura
PET2 1a clon aïllat	pET21-T7-His	Vector pET2 1a amb el promotor T7 i 6 Hstidines	Fet al nostre laboratori
pCYC313	pBabe-puro TAP E47 ₁₋₂₂₀	Vector retroviral que expressa la proteïna E47 amb l'epítip TAP (CBP-Tev site-protA) sota el promotor US9	Fet al nostre laboratori
pCYC315	pBabe-puro TAP E47 ₁₀₀₋₅₅₁	Vector retroviral que expressa el fragment de la proteïna E47 amb l'epítip TAP (CBP-Tev site-protA) sota el promotor US10	Fet al nostre laboratori
pCYC316	pBabe-puro TAP control	Vector retroviral que expressa l'epítip TAP (CBP-Tev site-protA) sota el promotor US11	Fet al nostre laboratori
pCYC 304	pCMV-TAP- E47 (1-651aa)	Expressa E47 full length i l'epítip TAP sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC 306	pCMV-TAP- E47(1-220aa)	Conté l'epítip TAP. Expressa la part N-terminal d'E47 de l'aa 1al 220 sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC831a	pCMV-TAP- E47 (220-330aa)	Conté l'epítip TAP. Expressa E47 de l'aa 220 al 330 sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC830a	pCMV-TAP- E47 (330-400aa)	Conté l'epítip TAP. Expressa la part C-terminal d'E47 de l'aa 330 al 460 sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC925a	pCMV-TAP- E47 (330-460aa)	Conté l'epítip TAP. Expressa la part C-terminal d'E47 de l'aa 330 al 400 sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC 305	pCMV-TAP- E47(1-540aa)	Conté l'epítip TAP. Expressa la part N-terminal d'E47 de l'aa 1al 540 sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC 307	pCMV-TAP- E47(100-540aa)	Conté l'epítip TAP. Expressa la part N-terminal d'E47 de l'aa 100 al 540 sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC 308	pCMV-TAP- E47(100-490aa)	Conté l'epítip TAP. Expressa la part N-terminal d'E47 de l'aa 100 al 490 sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC836a	pCMV-TAP- E47 (330-400aa) S341A	Expressa el fragment d'aminoàcids 330-400 d'E47 amb la serina 341 mutada a alanina.	Fet al nostre laboratori
pCYC837a	pCMV-TAP- E47 (330-400aa) S352A, T355A, S359A	Expressa el fragment d'aminoàcids 330-400 d'E47 amb la serina 341 mutada a alanina.	Fet al nostre laboratori
pCYC838a	pCMV-TAP- E47 (330-400aa) S379A	Expressa el fragment d'aminoàcids 330-400 d'E47 amb la serina 379 mutada a Alanina.	Fet al nostre laboratori
pCYC926a	pCMV-TAP- E47 (330-460aa) SSTSS	Expressa el fragment d'aminoàcids 330-460 d'E47 amb les serines 341, 352, 359, 379 i la treonina 355 mutades a Alanina.	Fet al nostre laboratori
pcDNA3-E47	pcDNA3-E47	Vector pcDNA3. Expressa E47 sota el promotor CMV	Nakamura Lab
pCYC805a	pcDNA3-E47 S379A	Expressa E47 amb la serina 379 mutada a Alanina sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC899a	pcDNA3-E47 S379A, S352A, T355A, S359A	Expressa E47 amb les serines 352, 359 i la treonina 355, 379 mutades a Alanina sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC920a	pcDNA3-E47 S341A, S352A, T355A, S359A, S379A	Expressa E47 amb les serines 341, 352, 359, 379 i la treonina 355 mutades a Alanina sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC907	pGEX-E47(330-460aa)	Vector d'expressió en bacteris per la proteïna E47 del fragment 330-460aa, amb l'epítip GST i sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC903	pGEX-E47(360-460aa)	Vector d'expressió en bacteris per la proteïna E47 del fragment 360-460aa, amb l'epítip GST i sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC921a	pGEX-KG-E47 (330-460) S341A, S352A, T355A, S359A, S379A	Vector d'expressió en bacteris per la proteïna E47 del fragment 330-460aa amb les serines 341, 352, 359, 379 i la treonina 355 mutades a Alanina, amb l'epítip GST i sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC905	pGEX-E47 S379(360-460aa)	Vector d'expressió en bacteris per la proteïna E47 del fragment 360-460aa amb la serina 379 mutada a alanina, amb l'epítip GST i sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC573	pcDNA3-FLAG-MLK2	Expressa MLK2 (941aa) sota el promotor CMV amb 3 epitops FLAG.	Fet al nostre laboratori
pCYC833a	pcDNA3-FLAG-Nterminal MLK2 (1-364aa)	Expressa l'N-terminal de MLK2 (1-364aa) en el vector pcDNA3FLAG5'. No inclou la cremallera de leucines	Fet al nostre laboratori
pCYC844a	pcDNA3-FLAG-Nterminal MLK2 (1-757aa)	Expressa l'N-terminal llarg d'MLK2 (1-757aa) en el vector pcDNA3FLAG5'	Fet al nostre laboratori
pCYC716a	pcDNA3-FLAG-Cterminal(667-941aa) MLK2	Expressa els 274 darrers aa de MLK2 (667-941aa) en el vector pcDNA3FLAG5'	Fet al nostre laboratori
pCYC742	pcDNA3-FLAG-MLK2 K125A	Expressa MLK2 amb la mutació K125A sense activitat quinasa en el vector pcDNA3FLAG5'	Fet al nostre laboratori
pCYC846a	N-terminal MLK2 (1-496aa) in pGEX-KG	Vector d'expressió en bacteris per la proteïna MLK2 del fragment N-terminal de l'aa 1al 460, amb l'epítip GST i sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC848a	N-terminal MLK2 KD (1-496aa) in pGEX-KG	Vector d'expressió en bacteris per la proteïna MLK2-KD sense activitat quinasa del fragment N-terminal de l'aa 1al 460, amb l'epítip GST i sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
HA-JNK-TA/YF	pcDNA3-HA	JNK no fosforilable per MKK7 (dominant negatiu)	C. Caelles lab
pCYC219	pGL3basic-HsTrkB promoter	Vector amb el promotor de Hs-TrkB i el gen reporter de la luciferassa	Fet al nostre laboratori
pCYC234	pGL3basic-Hs p21 promoter	Vector amb el promotor de Hs-p21 i el gen reporter de la luciferassa	Fet al nostre laboratori

MATERIALS I MÈTODES

NOM	VECTOR	DESCRIPCIÓ	REF.
pCYC311	FLAG-mmKIS-pcDNA3	Vector d'expressió de KIS amb l'epítot FLAG sota el promotor de CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC444a	FLAG-mmKIS (K54A)-pcDNA3 (kinase death mutant)	Vector d'expressió de KIS-KD (sense activitat quinasa) amb l'epítot FLAG sota el promotor de CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC523a	FLAG-mmKIS-C-terminal-pcDNA3	Vector d'expressió del fragment C-terminal de l'aa 304 al 419 de KIS amb l'epítot FLAG sota el promotor de CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC443a	FLAG-mmKIS-N-terminal-pcDNA3	Vector d'expressió del fragment N-terminal de l'aa 1 al 318 de KIS amb l'epítot FLAG sota el promotor de CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC1009a	FLAG-mmKIS T320A-pcDNA3	Expressa KIS amb la Treonina 320 mutada a Alanina i l'epítot FLAG sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC1010a	FLAG-mmKIS S301A/T320A-pcDNA3	Expressa l'epítot FLAG KIS amb la Serina 301 i la Treonina 320 mutada a Alanina sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC1011b	FLAG-mmKIS S301A-pcDNA3	Expressa l'epítot FLAG KIS amb la Serina 301 mutada a Alanina sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC721a	NUFIP1-pNBM 470	Expressa la proteïna NUFIP1 amb 3 epítots HA sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC980	Borealin-pNBM 470	Expressa la proteïna Borealin amb 3 epítots HA sota el promotor CMV	Fet al nostre laboratori
pCYC666	KIF3A C-tal(long)-pNBM 470	Expressa el fragment C-terminal dels aa 471 al 724 de KIF3A amb 3 epítots HA	Fet al nostre laboratori
pCYC734	pDSL KIS FLAG ΔGFP-UbIC	Vector lentiviral que expressa la proteïna KIS amb l'epítot FLAG sota el promotor CMV. L'epítot GFP s'ha delecionat del vector.	Fet al nostre laboratori
pCYC1017a	pDSLΔGFP-HA-NUFIP1	Vector lentiviral que expressa la proteïna NUFIP1 amb l'epítot HA sota el promotor CMV. L'epítot GFP s'ha delecionat del vector.	Fet al nostre laboratori
pCYC1015a	pDSLΔGFP-HA-Borealin	Vector lentiviral que expressa la proteïna Borealina amb l'epítot HA sota el promotor CMV. L'epítot GFP s'ha delecionat del vector.	Fet al nostre laboratori
pCYC896	pDSLΔGFP-UBIip-3HA-CBP-KIS	Vector lentiviral que expressa la fusió 3HA-CBP-KIS sota el promotor UBI-c humà. L'epítot GFP s'ha delecionat del vector.	Fet al nostre laboratori
pCYC703	pET21a-KIS-6HIS	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS amb 6 Histidines sota el promotor T7	Fet al nostre laboratori
pCYC1060a	pET21a-KIS-Y93F-6HIS	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS amb la Tirosina Y93 mutada a Fenilalanina sota el promotor T7.	Fet al nostre laboratori
pCYC1061a	pET21a-KIS-Y340F-6HIS	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS amb la Tirosina Y340 mutada a Fenilalanina sota el promotor T7.	Fet al nostre laboratori
pCYC694a	pGEX-KG-KIS	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS amb l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC675	pGEX-KG KIS KD	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS sense activitat quinasa (KD) amb l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC945a	pGEX-KG-KIS S100A	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS amb la Serina 100 mutada a Alanina, amb l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC957a	pGEX-KG-KIS S301A	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS amb la Serina 301 mutada a Alanina, amb l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC956a	pGEX-KG-KIS T320A	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS amb la Treonina 320 mutada a Alanina, amb l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC994a	pGEX-KG-KIS T320A S301A	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS amb la Treonina 320 i la Serina 301 mutada a Alanina, amb l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC992a	pGEX-KG-KISKD Y93F	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS sense activitat quinasa (KD) amb la Tirosina 93 mutada a Fenilalanina i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC993a	pGEX-KG-KISKD Y340F	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS sense activitat quinasa (KD) amb la Tirosina 340 mutada a Fenilalanina i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC947a	pGEX-KG-KIS Y340F	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS amb la Tirosina 340 mutada a Fenilalanina i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC946a	pGEX-KG-KIS Y93F	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIS amb la Tirosina 93 mutada a Fenilalanina i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC948a	pGEX-KG eIF2B1	Vector d'expressió en bacteris, expressa eIF2B1 amb l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC1047a	pGEX-KG-eIF2B1(207-305)	Vector d'expressió en bacteris, expressa Borealin desde l'aa 207 al 305 i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC701	pGEX-KG KIF3A	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIF3A amb l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC692b	pGEX-KG-Cterminal KIF3A	Vector d'expressió en bacteris, expressa KIF3A desde l'aa 350 l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC940	pGEX-KG-NonO	Vector d'expressió en bacteris, expressa NonO i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC1044a	pGEX-KG-NonO (367-471)	Vector d'expressió en bacteris, expressa Hs NonO desde l'aa 367 al 471 i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC965a	pGEX-KG-NUFIP	Vector d'expressió en bacteris, expressa NUFIP1 i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC1045a	pGEX-KG-NUFIP1(12-122)	Vector d'expressió en bacteris, expressa l'N-terminal de NUFIP1 desde l'aa 12 al 122 i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC1046a	pGEX-KG-NUFIP(337-443)	Vector d'expressió en bacteris, expressa l'C-terminal de NUFIP1 desde l'aa 337 al 443 i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC962a	pGEX-KG-Borealin	Vector d'expressió en bacteris, expressa HsBorealin i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori

NOM	VECTOR	DESCRIPCIÓ	REF.
pCYC1042a	pGEX-KG-Borealin (98-232)	Vector d'expressió en bacteris, expressa Borealin desde l'aa 98 al 232 i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC961a	pGEX-KG-p27	Vector d'expressió en bacteris, expressa p27 i l'epítot GST sota el promotor Tac.	Fet al nostre laboratori
pCYC1032	KIS shRNA SIGMA 2	Vector shRNA d'interferència de KIS. TRCN0000027660 pLKO.1-puro	SIGMA
pCYC1088a	pDSL GFP ShKIS(S2)	Vector penmH1 amb shRNA d'interferència de KIS (S2) amb el marcador GFP en el vector	Fet al nostre laboratori
pCYC1054	Sh RNA SCR	shRNA SCR SIGMA CONTROL. pLKO.1-puro. Seq: shc002	SIGMA
pCYC1090a	pDSL GFP Shctrl	Vector shRNA d'interferència control (Scr) amb el marcador GFP en el vector	Fet al nostre laboratori
pCYC1052	sh RNA NUFIP- pLKO.1	Vector shRNA d'interferència de NUFIP1mm. TRCN0000240755 pLKO.1-puro	SIGMA
pCYC1089a	pDSL GFP ShNUFIP	Vector shRNA d'interferència de NUFIP1mm amb el marcador GFP en el vector	Fet al nostre laboratori

Taula 4 . Vectors plasmídics i lentivirals utilitzats.

En els vectors pcDNA3, pCMV-Sport6, pet21a o pGEX-KG s'han clonat els ORF (*Open Reading Frame*) i les fusions de les proteïnes amb les que hem treballat i els promotors CMV o Ubiquirina.

Per realitzar **mutacions puntuals o deleccions** hem usat la mutagènesi dirigida per PCR segons el mètode descrit en *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)*.

Les construccions **lentivirals** s'han efectuat en el vector pDSL-hpUG (ATCC) seguint els protocols de clonació basats en recombinació *GATEWAY Technology* (Invitrogen), havent eliminat en alguns casos la fusió GFP i/o substituït el promotor constitutiu CMV pel promotor del gen de la ubiquitina (Ubi).

Les construccions dels **shRNAs** es van fer dissenyant dos oligonucleòtids complementaris(Ref. ATCC) clonats finalment en un vector lentiviral. En cada un dels oligonucleòtids es posava una seqüència pel gen a silenciar i a continuació la mateixa però invertida, posant entre aquestes una seqüència responsable de formar el cap d'agulla (*Hairpin*). Aquest disseny permet que després de l'anellament dels dos oligonucleòtids complementaris, i un cop clonat a un vector, la seva expressió formi una doble cadena de mRNA per silenciar el gen candidat. Un cop obtingut el cassette amb els dos oligonucleòtids anellats es va clonar al vector pEN_mH1c (AfCS), i posteriorment es va recombinar al vector lentiviral pDSL.

46. Transfeccions i tractaments cel·lulars

Les cèl·lules es planten en plaques tractades amb col·lagen tant per les HEK293T com per les SHSY-5Y. Quan les cèl·lules han envaït tota la placa però sense que aquesta estigui confluent (12-24h) es procedeix a la seva transfecció amb Lipofectamina 2000 (Invitrogen): S'utilitza en la majoria de les transfeccions excepte quan la quantitat a transfectar és molt elevada que hem optat per utilitzar PEI (producció de virus). Per plaques de 4 pous, es dilueix 1µg de DNA en 50µl d'Opti-MEM (invitrogen) i es mescla suaument. Paral·lelament es mescla 2µl de lipofectamina amb 50µl d'OptiMEM i s'incuba a temperatura ambient durant 5 minuts. Després de la incubació es mescla la dilució del DNA i la de la lipofectamina suaument i es deixa que formin complexos durant 20 minuts a temperatura ambient. En el cas de les HEK293T les cèl·lules es renten amb Opti-MEM pre-escalfat a 37°C, on finalment s'hi afegeix la mescla DNA-lipofectamina procurant que les cèl·lules quedin tapades. S'incuba en atmosfera humida amb un 5% de CO₂ a a 37°C durant 15 minuts. Passat aquest temps s'aspira la mescla del pou i es substitueix per medi D-MEM amb 10% de sèrum. Les cèl·lules transfectades s'incuben com habitualment en atmosfera humida al 5% de CO₂ a 37°C. En el cas de les SHSY-5Y no cal retirar el sèrum del medi cel·lular, s'afegeix la mescla del DNA-lipofectamina i es deixa fins a 12h moment en que es canvia tot el medi per D-MEM 10% de sèrum amb o sense RA segons convingui. Per les cèl·lules granulars de cerebel de rata la transfecció amb lipofectamina es fa seguint les mateixes indicacions que per les SHSY-5Y, en el cas dels MEFs es segueixen les indicacions de les HEK293T.

46.1. Tractament dels extrems cel·lulars amb fosfatases

Les cèl·lules HEK-293T es co-transfecten amb E47 i MLK2 en plaques de 60mm. Un dia després d'haver-se transfectat, les cèl·lules es lisen en 200µl de tampó de lisi (20mM HEPES-KOH, pH7.9; 125mM NaCl; 0,1% Nonidet P-40; 1mM EDTA; 1mM PMSF (fenilmetilsulfonil fluoride); inhibidors de proteases) i es soniquen en gel fins que perden viscositat (2x 10 segons). Es centrifuguen durant 10 min a 16100xg. El sobrenadant es divideix en aliquotes de 50µl i es tracten amb 4U de SAP (*shrimp alkaline phosphatase*, Roche), amb 400U de fosfatasa λ (New England Biolabs) o/i amb inhibidors

de fosfatases (1mM de fluorur de sodi; 1mM de β -glicerofosfat, 5mM de pirofosfat de sodi i 1mM d'EGTA). Les mostres que porten SAP s'incuben durant 90 minuts a 37°C i les tractades amb fosfatasa λ a 30°C durant el mateix temps. La reacció s'atura amb el tampó de càrrega 2x SDS-PAGE (20% Sacarosa; 0,02% Blau-bromofenol; 8% SDS; 0,5M Tris-HCl pH6,8) i s'analitza per *Western blot*.

46.2. Tractament amb inhibidor de MLK2

L'inhibidor de les MLKs CEP-11004 es va obtenir de la casa Cephalon, Inc. (West Chester, PA). La solució mare a 4mM es va preparar amb DMSO (dimetil sulfòxid) i la concentració de treball a 400nM preparat en un 1% de BSA/medi D-MEM la qual s'aplicava a les cèl·lules ja transfectades durant 24h.

46.3. Tractament amb inhibidor de JNK

L'inhibidor de les JNK SP00125 (Sigma) es va usar en cèl·lules transfectades amb MLK2 durant 24h prèvies al processament cel·lular. La solució mare es va preparar amb DMSO (dimetil sulfòxid) i la concentració de treball va ser de dues dosis a 18,2 μ M i 72,8 μ M preparat en un 1% de BSA/medi D-MEM.

47. Obtenció de Lentivirus en cèl·lules HEK-293T i infecció

Es planten cèl·lules HEK-293T unes 12-24h abans de la transfecció en plaques de 10cm tractades amb col·lagen a $2 \cdot 10^6$ cèl·lules per placa. Es transfecten 24 μ g de DNA per placa de 10cm amb la següent proporció dels següents vectors: -12 μ g del vector lentiviral d'interès; -6 μ g de pVSV-G (plàsmid que codifica per l'embolcall víric); -6 μ g de p Δ R (plàsmid que codifica per l'empaquetament víric i que conté les proteïnes gag i pol).

Es dilueixen els tres plàsmids en 1.5ml d'OptiMEM i paral·lelament es dilueixen 240 μ l de 10 μ M PEI (polietienimina) en 1.26ml d'OptiMEM. S'afegeix la dilució de PEI sobre la del DNA, es barreja molt suaument durant 2-5 seg i s'incuba durant 10 minuts a temperatura ambient. Les plaques amb cèl·lules

MATERIALS I MÈTODES

es renten 1x amb Opti-MEM, el qual s'aspira i s'afegeix la mescla de DNA-PEI procurant que cobreixi tota la superfície de la placa. S'incuba durant una hora a l'incubador a 37°C. Un cop passat aquest temps s'elimina el medi de transfecció i s'afegeixen 10ml de medi D-MEM amb 10% de sèrum en el cas d'infectar HEK-293T, SHSY-5Y o MEFs. En el cas d'infectar cultius neuronals primaris quan es canvia el medi de transfecció es canvia per Neurobasal (Gibco). A les 48h i abans que el medi s'acidifiqui virant de color roig a groc es recull el sobrenadant on es troben els virus i es filtren amb una membrana de nitrocel·lulosa de 0.45µm de diàmetre en una campana de seguretat biològica BioIIA. Els virus es guarden en tubs de poliestirè a 4°C durant una setmana com a màxim.

Per la infecció dels cultius es substitueix la meitat del medi de cultiu de les cèl·lules que es volen infectar pel medi amb virus. Si el medi de cultiu porta suplementes aquests també s'afegiran al medi on es troben els virus. A les 24h d'infecció es retiren els virus substituint el medi per medi nou o en el cas dels cultius d'hipocamp per $\frac{3}{4}$ de medi de cultius corticals no infectats i $\frac{1}{4}$ de medi nou. Es mantenen els cultius expressant la infecció durant 3-4 dies o una setmana en el cas dels cultius neuronals procedint a un canvi de medi cada 4 dies. Passat aquest temps els cultius es processen pel seu estudi (Immunofluorescència, Immunoprecipitació, *Western blot*, Purificació de Grànuls).

48. Producció d'un anticòs policlonal contra la KIS

Per la producció d'un anticòs de KIS vam purificar de forma desnaturant 12,8mg de 6HIS-KIS a una concentració de 4µg/µl produït heteròlogament en bactèries *E.Coli BL21* tal com hem descrit en l'apartat 50 seguint el protocol n°10 de *The QIAexpressionist* (Qiagen). El *pellet* de 500ml de cultiu es va ressuspèndre en 25ml de tampó B de lisis (100mM NaH₂PO₄; 10mM Tris-HCl pH8; 8M Urea; pH8) i lisar sonicant en gel 4 períodes de 30 segons a una potència de 200-300W deixant refredar els extrems durant 30 segons en gel. Seguidament es van centrifugar els extrems a 10000xg durant 15 minuts a temperatura ambient. La proteïna heteròloga formava cossos

d'inclusió per la qual cosa es va optar per purificar la proteïna del *pellet* en lloc del sobrenadant. Un cop es va obtenir el *pellet* dels lisats centrifugats, es va ressuspèndre dues vegades consecutives en 25ml de tampó B sense Urea i es va centrifugar a 10000xg 15 minuts dues vegades. El *pellet* resultant de la segona centrifugació es va ressuspèndre en 4 ml de tampó B sense Urea al qual se li va afegir 2xSSR per poder purificar-lo per electroforesi preparativa en un gel SDS-PAGE del 10%. L'electroforesi va córrer durant 6h a 75mA i en vam recollir eluats de 4ml durant 6h. Vam ajuntar i concentrar en 3ml els eluats del nº50 al 82 que contien HIS-KIS correguts en gels d'acrilamida tenyits en coomassie vam observar la presència de HIS-KIS (**Figura 54**). Aquests eluats concentrats són els que vam utilitzar per immunitzar conills i obtenir l'anticòs contra la proteïna sencera de KIS amb la col·laboració de l'empresa AbBcn.

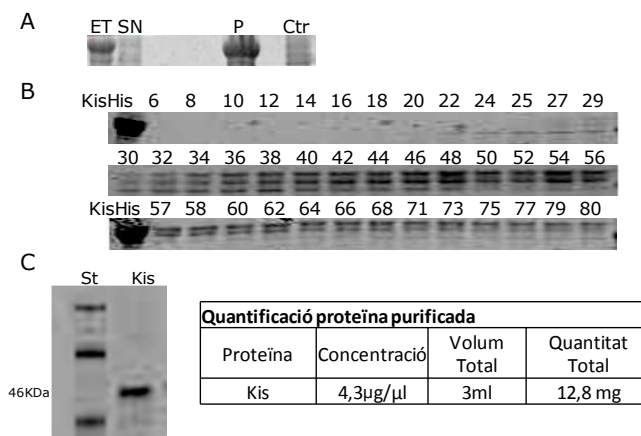


Figura 54. Proteïna KIS purificada per electroforesi preparativa. (A) Purificació de la proteïna KIS recombinant fusionada amb histidines present en els cossos d'inclusió d'un cultiu de bacteris *E.Coli* BL21. ET (extret total), SN (Sobrenadant), P (*pellet*), Ctr (Control) (B) Eluats d'electroforesi preparativa correguts en gels d'acrilamida tenyits amb coomassie blue. (C) La proteïna recombinant de KIS es va acabar de purificar a través d'electroforesi preparativa, on només els eluats que contien la mida correcte de la proteïna es van concentrar i quantificar (del 50 al 80).

49. Purificació per Afinitat en Tàndem (TAP)

Per identificar proteïnes que poden interaccionar amb la proteïna E47 es va utilitzar el sistema de purificació per doble afinitat TAP (*Tandem Affinity Purification*). Per dur a terme aquesta tècnica vam fusionar la part N-terminal

MATERIALS I MÈTODES

del 1 al 220aa (pCYC313) o C-terminal del aa 100 al 651 (pCYC315) de l'E47 a l'epítot TAP, o l'epítot sol (pCYC315) en el vector d'expressió retroviral pBABE-puro (pCYC331). L'epítot TAP conté proteïna A capaç d'unir-se a Immunoglobulines (IgG), una seqüència d'unió a Calmodulina (CBP, *Calmodulin Binding Peptide*) i entre aquestes dues, una seqüència de tall per la proteasa TEV (*Tobacco Etch virus*) (**Figura 54A-D**). Es van produir retrovirus dels vectors mencionats en la línia cel·lular empaquetadora GP2-293T co-transfectant-hi el vector per produir la càpsida dels virus pVSV-G i les construccions del nostre interès. Per la transfecció es va utilitzar PEI. Les cèl·lules es van mantenir a 32°C en medi Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) suplementat al 10% de sèrum boví fetal. Es va recollir a les 48, 72 i 96h i filtrar (0.45 µm) el sobrenadant que contenia els virus. Amb aquests es van infectar línies de SHSY-5Y durant 2 dies i posteriorment seleccionar amb 0,25µg/ml de puromicina per tal d'obtenir línies estables de cada construcció. Es van posar a créixer en 30 plaques de 15cm per cada línia estable transformada, deu de les quals es van deixar en proliferació durant 3 dies (ciclant) i les altres 20 es van diferenciar amb 10µM d'àcid retinoic (RA) durant 5 dies. Es van recollir els extrems cel·lulars i es van purificar les proteïnes unides al complex d'E47 per cromatografia d'afinitat per purificació en tàndem (TAP, *Tandem affinity Purification*): la primera immunoprecipitació es va fer amb reïna de *IgG-sepharose Fast Flow beads* (Amersham Biosciences) eluint tallant amb la proteasa TEV i després tornant a purificar amb reïna de calmodulina. Posteriorment es van enviar les mostres unides a la reïna de calmodulina rentades amb sulfat amònic i, amb col·laboració amb el CNIO, es van analitzar els complexos per nano-cromatografia líquida associada a ionització per nano-electrosprai i espectrometria de masses en tàndem (nanoLC-electrosprayMS/MS).

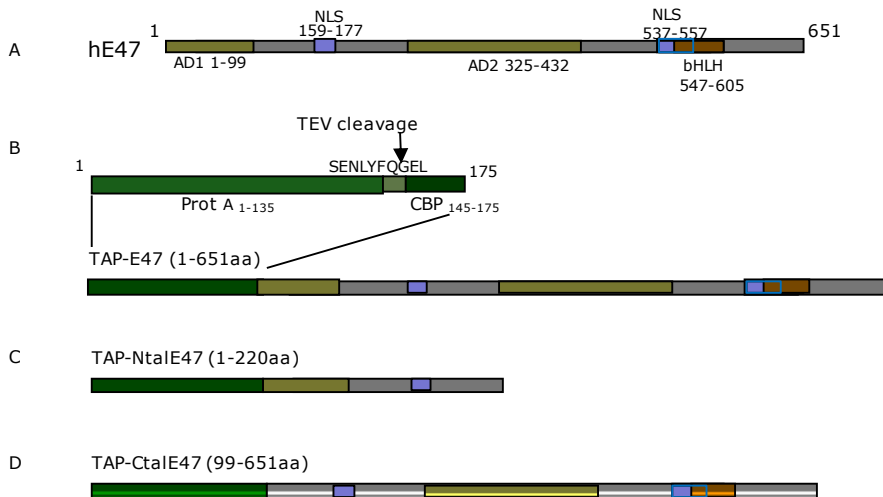


Figura 55. Construccions utilitzades en la purificació de proteïnes per doble afinitat a l'E47 (TAP, Tandem Affinity Purification). (A) Esquema dels diferents dominis d'E47 on AD1 i AD2 són dominis d'activació, NLS són dominis de localització nuclear i bHLH és el motiu basic Helix Loop Helix . (B) Esquema de la fusió de l'epítot TAP a la proteïna d'E47 humana. L'epítot TAP conté un fragment que codifica per la proteïna A, una seqüència de tall de la proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*) i un lloc d'unió a Calmodulina (CBP, *Calmodulin Binding Peptide*). (C) Esquema de la fusió de l'epítot TAP a la part N-terminal de la proteïna E47 humana. (D) Esquema de la fusió de l'epítot TAP a la part C-terminal de la proteïna E47 humana.

50. Immunoprecipitació (IP)

50.1. IP de proteïnes sobreexpressades

Les cèl·lules HEK293T, o les neurones corticals es recullen després d'haver estat transfectades durant 24h plantades en plaques de 60mm amb les construccions corresponents en 1ml de tampó PBS 1X i es centrifuguen molt suaument a 100xg a 4°C. Seguidament es ressuspenen amb 450µl tampó de lisis (20mM HEPES-KOH, pH7.9; 125mM NaCl; 0,1% Nonidet P-40; 1mM EDTA; 1mM PMSF (fenilmetilsulfonil fluoride) i altres inhibidors de proteases i fosfatases), i es soniquen en gel fins que perden viscositat (2x 10 segons). Es centrifuguen durant 10 min a max 16100xg. El sobrenadant resultant s'incuba amb 25µl de reïna netes de FLAG M2-agarosa (Sigma) durant 2h a 4°C en un agitador orbital. La reïna es recupera després d'una centrifugació de 10 segons a 4°C a 100xg i es renta 3 vegades amb 1mL de tampó de lisi fred. Finalment la reïna es ressuspen en tampó de càrrega

MATERIALS I MÈTODES

2xSDS-PAGE (20% Sacarosa; 0,02% Blau-bromofenol; 8% SDS; 0,5M Tris-HCl pH6,8) per a gels d'acrilamida, i es procedeix al seu anàlisi per *Western blot*.

50.2. IP endògena en extrets de cervell de ratolí

La proteïna endògena KIS o de KIF3A es va immunoprecipitar a partir de 1,5ml d'extret de cervell (a una concentració de 30mg/ml) de ratolí adult obtingut seguint el protocol descrit anteriorment en (Giorgi *et al.* 2007) amb 40µl de KIS antisèrum (AbBcn). L'anticòs va estar produït en conills immunitzats amb la proteïna purificada HIS-KIS tal com està descrit en l'apartat 44. Per detectar les proteïnes endògenes en la immunoprecipitació de la KIS, es va evitar l'ús de 2-mercaptoetanol per evitar la interferència de la cadena pesada de les IgG la qual interfereix en pes molecular amb la detecció per *Western blot* (WB) de la KIS. El WB per les proteïnes endògenes es va fer seguint una incubació amb proteïna A (1:1,000; Sigma) i streptavidina unida a peroxidasa (1:1,000; Sigma).

51. Purificació de grànuls d'mRNA

Els grànuls d'mRNA es van aïllar modificant parcialment el protocol de (Kanai, Dohmae & Hirokawa 2004). Es van cultivar *in vitro* durant 8 dies neurones d'hipocamp procedents de rates embrionàries de 17 dies o neurones corticals de ratolí embrionaris de 14 dies. Alguns d'aquests cultius havien estat infectades amb construccions lentivirals en 3 plaques de 35mm per cada condició. Els extrets cel·lulars es van recollir en 200ml de tampó IMAC (20mM HEPES pH7.4; 140mM de acetat potassi; 1mM d'acetat de magnesi; 1mM d'EGTA; inhibidors de proteases) i en cas necessari 100U/ml d'inhibidor d'RNase (Invitrogen). Les mostres es van homogeneïtzar passant-les 15 vegades per una xeringa de 0,5x16mm. Seguidament, l'homogenat es va fraccionar a través de centrifugacions successives a 4°C. La primera a 1000xg descartant el *pellet* (P1) on hi queden els nuclis, a la segona centrifugació a 10000xg es descarta el reticle endoplasmàtic i les membranes grans (P2) i finalment en la tercera centrifugació a 100000xg s'obtenen els grànuls d'RNA en el *pellet* (P3).

52. Western blot

Les cèl·lules es renten amb PBS a 4°C i es recullen en el volum necessari de 1xSR per placa (200µl per una placa de 10cm). Seguidament les cèl·lules se soniquen fins que perden la viscositat i es puguin pipetejar. En aquest moment mesurem la quantitat de proteïna per absorbència a 280nm, a l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), per poder carregar les mateixes quantitats de proteïna de cada mostra. Afegim el volum corresponent de 4xSS (20% sacarosa i 0,05% blau de bromofenol) fins a obtenir una concentració final de 1x SS i un 2% final de 2-mercaptoetanol. Finalment les mostres es bullen durant 5 minuts a 95°C abans de carregar-les en un gel d'acrilamida. Carreguem entre 30 i 100µg de proteïna per carril.

L'electroforesi en gels de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) s'utilitza per a separar proteïnes segons el seu pes molecular en condicions desnaturalitzants. En el nostre cas utilitzem el sistema de Miniprotean de Biorad.

Un cop les proteïnes han estat separades per l'electroforesi, es transfereixen a una membrana de PVDF (Millipore). Un cop les proteïnes estan transferides, la membrana es bloqueja amb una solució que conté un 5% de llet desnatada en tampó TBST (20mM Tris, 0,125M NaCl, 0,1% Tween20), durant una hora a temperatura ambient o durant tota la nit a 4°C. La membrana es renta amb tampó TBST i s'incuba amb l'anticòs primari diluït en un tampó que conté 0,25% de llet i TBST. Depenent de l'anticòs que utilitzem es fa una dilució i un temps d'incubació determinats (**Taula 5**). Es torna a rentar la membrana amb TBST i es tracta amb el corresponent anticòs secundari conjugat a peroxidasa (Amersham), que rutinàriament es va utilitzar a una dilució 1:12500. Els últims rentats es fan amb TBST i s'incuba la membrana durant 5 minuts amb el substrat quimioluminiscent SuperSignal West Dura (Pierce). Les proteïnes a estudiar es detecten a l'aparell Lumi-Imager, que disposa d'una càmera CCD (Boehringer Mannheim) a baixa temperatura. La quantificació de bandes es va dur a terme amb el software del mateix aparell.

MATERIALS I MÈTODES

Antigen	Referència	Dilució per IF	Dilució per WB
E47	SC-763. Policlonal rabbit		1:200
FLAG	SIGMA. Monoclonal mouse		1:200
pS63-c-Jun	Cell Signaling. Policlonal rabbit		1:1000
JNK	Cell Signaling. Policlonal rabbit		1:1000
NeuroD	N-19. Policlonal goat		1:100
PAP	Policlonal goat		1:2000
HA	Roche. Monoclonal rat 3F10	1:200	1:2500
KIS	K-53. Policlonal rabbit. Col·laboració AbBcn		1:50
NonO	Monoclonal mouse BD Transduction Cat. 611278		1:1000
KIF3A	Monoclonal mouse BD Transduction Cat. 6111508		1:250
eEF1A	CBP-KK1. Monoclonal mouse. Upstate Biotechnology		1:200
eEF1B2	Int6. Policlonal rabbit		1:250
eIF3S6	Int6. Policlonal rabbit		1:200
Borealina	H41 SC-98869. Policlonal Rabbit Sta. Cruz		1:200
Alexa 488 Goat anti-Rat	Molecular Probes Cat. A- 11006	1:200 / 1:1000	
proteïnaA-Biotina	SIGMA		1:5000
Streptavidina-Peroxidasa	SIGMA		1:5000
Ratolí-Peroxidasa	ECL Donkey Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase- Linked. GE Healthcare		1:12500
Conill-Peroxidasa	ECL Donkey Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase- Linked. GE Healthcare		1:12500
Cabra-Peroxidasa	Donkey anti-goat IgG-HRP. sc-2020. Santa Cruz Biotechnology		1:1000
Rata-Peroxidasa	Goat anti-rat IgG-HRP. Jackson Immuno Research		1:12500

Taula 5. Anticossos usats per Immunofluorescència (IF) i western-blot (WB)

53. Assaigs Luciferasa

Es planten cèl·lules SHSY-5Y en plaques de 24 pous tractades amb col·lagen en proliferació a una densitat de 75000 cèl·lules/cm² o en procés de diferenciació amb 10 µM d'àcid retinoic a una densitat de 50000 cèl·lules/cm². La transfecció es fa amb Lipofectamina 2000 (Invitrogen) i cada mostra per triplicat. En el cas de les cèl·lules ciclant es transfecta 24h després d'haver-se plantat, i les diferenciades es planten amb tres dies d'anterioritat i es mantenen amb RA. L'activitat luciferasa es va mesurar a les 48h d'haver-se transfectat. Els assajos luciferasa es fan seguint les indicacions del sistema de luciferasa de doble reporter (#TM040, Promega). L'activitat luciferasa de *firefly* (pGL3b, Promega) es relativitza a l'activitat luciferasa de *Renilla*. Es transfecta 1µg del plàsmid reporter luciferasa *firefly* i 0.05µg del plàsmid de control luciferasa *Renilla* pRL-TK (Promega) en cèl·lules SHSY-5Y per determinar els valors relatius d'expressió. Per observar els efectes produïts per E47 o MLK2 en els promotors de TrkB o p21^{CIP} clonats en pGL3b, es van transfectar 0.8µg de cada vector d'expressió luciferasa o 0.2µg del plàsmid no reporter. La relació entre l'activitat luciferasa de la *Firefly/Renilla* obtinguda de la mostra del vector control sense promotor s'utilitza com a *fons (background)* i els valors obtinguts en un luminòmetre es van normalitzar en funció a aquest.

54. Producció i purificació de proteïna recombinant

Inicialment es van inocular 10ml de cultiu *E.Coli* BL21 transformat amb la construcció desitjada en medi LB per bacteris (1% Triptona, 1% NaCl, 0,5% extracte de llevat; a pH 7,5) a més de l'antibiòtic de selecció corresponent i es va deixar créixer tota la nit a 37°C. A continuació, es va fer una dilució 1/50 del cultiu on s'hi va afegir un 10% de glicerol deixant-ho a un volum final de 20ml. El cultiu es va deixar durant 45min-1h a 37°C. Seguidament, es canviava la temperatura del cultiu a 25°C o 30°C segons la proteïna a purificar (**Taula 6**) i es deixava fins que el cultiu arribava a una OD₆₀₀/ml de 0.3, moment en el qual s'induïa l'expressió de la proteïna

MATERIALS I MÈTODES

recombinant amb IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosidic). Segons la proteïna a purificar vam utilitzar unes condicions d'inducció i producció diferents (**Taula 6**). Aquestes variaven en el temps d'incubació (entre 4h i 14h) i amb dosis d'IPTG d'entre (0,4mM i 1mM). Tant pel cas de les construccions fusionades a GST com a histidines, la inducció del cultiu es va dur a terme de la mateixa manera.

Proteïna -GST (excepte especificat HIS)	(Construcció)	Tª producció proteïna	Inducció a OD ₆₀₀ /ml	temps d'inducció IPTG	concentració IPTG
MLK2 -Nt	pCYC846				
MLK2 KD-Nt	pCYC848				
E47 ₃₃₁₋₄₀₀	pCYC842				
E47 ₃₃₁₋₄₀₀ S379A	pCYC863	30°C	0.3	4h	0,4mM
E47 ₃₃₁₋₄₆₁	pCYC907				
E47 ₃₆₁₋₄₆₁	pCYC903				
E47 ₃₃₁₋₄₆₁ S/T5A	pCYC921				
E47 ₃₆₁₋₄₆₁ S379A	pCYC905				
KIS	pCYC694a				
KISKD	pCYC675				
KIS S101A	pCYC945a				
KIS S301	pCYC957a				
KIS T320A	pCYC956a				
KIS Y340F	pCYC947a	25°C	0.3	4h	0,4mM
KISY93F	pCYC946a				
KIS S/T-A	pCYC994a				
KIS Y93F KD	pCYC992a				
KIS340F KD	pCYC993a				
KIS HIS	pCYC703				
KIS Y340F HIS	pCYC1061a	30°C	0.3	4h	1mM
KISY93F HIS	pCYC1060a				
NonO	pCYC940	30°C	0.6	2h	0,4mM
NonO Ct	pCYC1044a				
Borealina-Ct	pCYC1042a				
Borealina	pCYC962a	30°C	0.3	4h	0,4mM
eIF2b1-Ct	pCYC1047a				
KIF3A-Ct	pCYC692b	25°C	0.3	4h	0,4mM
NUFIP	pCYC943				
NUFIP N-t	pCYC1045a	25°C	0.3	o/n	0,4mM
NUFIP C-t	pCYC1046a				

Taula 6. Condicions de temps i temperatura per purificar les proteïnes marcades amb l'epítot GST o HIS en bacteris *E.Coli* BL21.

La purificació de les proteïnes marcades amb **GST** es va dur a terme ressuspenent el *pellet* de 20ml de cultiu induït en 1 ml de tampó GSB (25mM HEPES; 0,3M KCl; 1mM EDTA; 0,1% NP-40; 10% glicerol; 1mM DTT;

MATERIALS I MÈTODES

inhibidors de proteases i fosfatases) i seguidament lisant les cèl·lules amb el sonicador (amb una micropunta) 4 vegades durant 30 segons en gel a 200-300W amb períodes de refredament de 30 segons entre cada un. Es van centrifugar els extrems a 16000xg a 4°C durant 15 minuts per quedar-nos amb la proteïna soluble en el sobrenadant i aquest es va incubar amb 40µl de reïna de *Glutathione-Sepharose 4B* (GE Healthcare) ja hidratades i equilibrades durant 1h a 4°C rodant. Després de 5 rentats de 5 minuts amb 1 ml de tampó GSB (centrifugar 1 minut a 100xg), les proteïnes unides a GST es van rentar 1 cop amb tampó d'elució sense Glutatió reduït i a continuació és van eluir amb 500µl de tampó d'elució preparat fresc (40mM Glutatió reduït; 20mM NaCl; 0,5Mm DTT; 65mM Tris-HCl pH8; 0,1% NP-40; pH6,5-7,5) deixant-ho incubar rodant durant 10 minuts a temperatura ambient en tubs de 500µl abans de centrifugar l'eluat en les columnes *micro Bio-Spin chromatography columns*, (Biorad). L'eluat es va concentrar utilitzant els filtres *Centrifugal Filter Units - Amicon Ultra-0,5mL 30K membrane* (Millipore) centrifugant a 16000xg a 4°C fins a obtenir un volum de 40µl. Als eluats se'ls va afegir el 5% de glicerol si es tractava de un substrat o el 10% si es tractava d'una quinasa, i es van guardar a -80°C. Per comprovar la quantitat i la qualitat de la purificació és van córrer gels de SDS-PAGE els quals es van tenyir amb blau de coomassie per visualitzar la purificació i la seva quantificació.

La purificació de les proteïnes marcades amb **6xhistidines** es va dur a terme de manera desnaturant seguint les indicacions de *The QIAexpressionist*, protocol 10 i 17 (Qiagen) amb reïna de *Ni-NTA Agarose* (Qiagen).

Algunes de les proteïnes substrats es van conservar unides a la reïna per intentar augmentar la quantitat obtinguda de proteïna purificada i poder dur a terme un assaig quinasa. Per aquest objectiu, un cop es va obtenir la proteïna unida a la reïna purificada, es van fer dos rentats amb 1ml de tampó quinasa (50mM HEPES, pH 7,5; 10mM MgCl₂; 2mM DTT) sense ATP, es van ressuspèndre en 40µl de tampó quinasa més un 5% de glicerol.

55. Assaig Quinasa *in vitro*

Els assajos quinasa es van fer en 20µl de tampó quinasa (50mM HEPES, pH 7,5; 10mM MgCl₂; 2mM DTT) afegint-hi 15µM d'ATP no-radioactiu i 10µCi de [γ -³²P] ATP utilitzant entre 1 i 5µg de substrat i 200ng de proteïna quinasa (KIS i MLK2). En el cas de la quinasa Src es van utilitzar 8ng pel fet de ser una quinasa molt activa. Les reaccions van tenir lloc durant 20 minuts a un bany de 30°C, i es van aturar afegint tampó 2xSSR i incubant durant 3 minuts a 95°C. Les mostres es van carregar en un gel SDS-PAGE del 10% a 70mA durant 100 minuts i posteriorment es va assecar el gel a 65°C durant una hora amb un sistema d'extracció al buit. L'assaig es va analitzar per autoradiografia. Les proteïnes (substrat i quinasa) utilitzades en un mateix assaig havien estat quantificades prèviament per gels de coomassie, tal com hem explicat anteriorment, procedents d'una mateixa purificació assegurant una càrrega equitativa per assaig, podent així comparar intensitats de fosforilació segons la condició de la mostra.

55.1. Tractament amb inh Src

Es va inhibir l'activitat quinasa de la proteïna purificada Src prèviament incubada amb la proteïna KIS afegint en el tampó quinasa l'inhibidor de Src PPI (Calbiochem) a dues dosis diferents: 20µM i 40µM. Seguidament es va dur a terme un assaig quinasa amb ATP³² radioactiu.

56. Immunofluorescència

En els cultius analitzats per immunofluorescència, es van utilitzar plaques de 12 o 4 pous en els quals s'hi havia introduït prèviament al cultiu cel·lular un cobreobjectes de vidre. Els cobreobjectes havien estat desengreixats en agitació amb etanol pur, rentats amb H₂O d i autoclavats. Seguidament les plaques es van tractar amb poli-D-lisina i laminia on s'hi van plantar les cèl·lules. En les neurones hipocampals o corticals de rata es van plantar 60000 cèl·lules en les plaques de 12 pous (vidre de 22mm) i 34000 cèl·lules en les plaques de 4 pous (vidre de 8mm).

MATERIALS I MÈTODES

Les cèl·lules es van rentar amb solució salina PBS 1X a 4°C i a continuació es van fixar amb una solució de paraformaldehid (PFA) al 4% i sacarosa al 4% durant 20 minuts a 4°C. Un cop es va rentar el fixador dues vegades amb PBS 1X fred durant 5 minuts, es van incubar durant 10 minuts a 4°C amb 50mM de NH₄Cl per fer un blanqueig de possibles fluorescències inespecífiques. Després d'un rentat amb PBS1X es van permeabilitzar les membranes cel·lulars amb 0,1% TritóX100-PBS durant 5 minuts a 4°C i es van fer dos rentats de 5 minuts amb PBS1X a temperatura ambient. A continuació, es van bloquejar amb sèrum normal de cabra (NGS) al 5% en PBS 1X durant 30 minuts a temperatura ambient i es van incubar amb l'anticòs primari de rata α -HA-3F10 a una dilució 1:100 en un 1% de la solució de bloqueig a temperatura ambient durant 4h o a 4°C tota la nit. Seguidament es va retirar l'anticòs fent 3 rentats amb PBS1X a temperatura ambient de cinc minuts cadascun i es va incubar amb l'anticòs secundari de cabra anti-rata conjugat amb l'alexa 488 a una dilució 1:1000 en la solució de bloqueig diluïda a 1% durant 30 minuts. Finalment després de 3 rentats amb PBS1X de 5 minuts cadascun es fa una incubació de 3 minuts amb Hoechst diluït 1:1000 en PBS 1X per marcar els nuclis. La immunofluorescència es va protegir amb 2 μ l d'Slow-Fade (Roche) i un portaobjectes desengreixat. Tots els anticossos es van centrifugar abans d'usar per eliminar impureses.

57. Detecció de l'mRNA de β -actina per Hibridació Fluorescent *in-situ* (FISH).

Per fer la *hibridació in-situ fluorescent* es va seguir el protocol descrit en (<http://www.singerlab.org/protocols>) en neurones corticals embrionàries expressant la construcció lentiviral HA-KIS. Les sondes en l'mRNA de β -actina escollides per (Huttelmaier *et al.* 2005) corresponen a les posicions següents:

TXCAATGGGGTACTXCAGGGTCAGGAXACCTCTCTTGXCTGGGCCTCGX,
XGCCTGTGGXACGACCAGAGGGCAXACAGGGACAGCACAGCCXGGATGGCX,
XCAGCAATGCCXGGGTACATGGTGGXACCACCAGACAGCACXGTGTTGGCAX, i
AGGGXGAGGGGACTTCCXGTAACCACTTAXTTCATGGAXACTTGGAAAXGAC. Les X

són grups amino-allyl C6-dT (DNA Technology A/S), els quals han estat marcats amb un *dye* Cy3 en 100mM de bicarbonat sòdic a pH 9.0 durant 2h a temperatura ambient tal com indiquen les instruccions (Amersham). Les sondes marcades es van purificar amb el Kit QiaexII (Qiagen). A continuació s'hibriden les cèl·lules amb les sondes i es fan els rentats corresponents. HA-KIS es va detectar per immunofluorescència amb un anticòs secundari marcat amb l'Alexa488. Les imatges es van prendre amb el microscopi confocal Olympus FV500 usant l'objectiu 60X en un microscopi invertit Olympus IX81.

58. PCR quantitativa

Per dur a terme les PCRs en temps real, primerament es va extreure l'mRNA de les cèl·lules o extreus immunoprecipitats endògens de KIS utilitzant el Kit *RNeasy Kit* (Qiagen). Els extreus es van tractar amb DNaseI (Qiagen) per evitar contaminació de DNA. Un cop es va obtenir l'mRNA es va quantificar amb l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) i es van transcriure a cDNA amb la *SuperscriptII reverse transcriptase* en quantitats equitatives. La quantitat relativa de l'mRNA de les mostres es va determinar per PCR en temps real, a través d'un equip *iCycler iQ real-time detection system* (Bio-Rad) i utilitzant l'*Applied Master Mix* i les sondes TaqMan (Applied Biosystems) pels gens mostrats a la **Taula 7** relativitzant-los al gen control tal com s'indica a l'apartat de resultats.

Taqman (Applied Biosystems)			
Gen	nom	sonda	espècie
ACTB	<i>β-actin</i>	00607939_s1	M. musculus
GRIA1	<i>Glutamate receptor, ionotropic AMPA1 (alpha 1)</i>	00433753_m1	M. musculus
GRIA2	<i>Glutamate receptor, ionotropic AMPA2 (alpha 2)</i>	00442822_m1	M. musculus
ARC	<i>Activity-regulated cytoskeletal-associated protein</i>	00479619_g1	M. musculus
MAPT	<i>Microtubule-associated protein Tau</i>	00521988_m1	M. musculus
MTAP2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>	00485236_m1	M. musculus
NTRK2	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor TrkB, type 2</i>	00435422_m1	M. musculus
TFRC	<i>Transferrin receptor</i>	00441941_m1	M. musculus
CAMKIIa	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha</i>	00437967_m1	M. musculus
SYAP1	<i>Synapse-associated protein 1</i>	00481965_m1	M. musculus
PGAM1	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	02526975_g1	M. musculus
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	99999915_g1	M. musculus
NTRK2	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor TrkB, type 2</i>	001778811_m1	H.sapiens
TFRC	<i>Transferrin receptor</i>	04333770F	H.sapiens
NTRK2 5'	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor TrkB, type 2</i>	01441749_m1	R.norvegicus
NTRK2 3'	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor TrkB, type 2</i>	00820626_m1	R.norvegicus
GAPDH	<i>Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase</i>	01749022_g1	R.norvegicus

Taula 7. Sondes Taqman utilitzades per Real Time PCR (Applied Biosystems)

BIBLIOGRAFIA

59. BIBLIOGRAFIA

- A**akalu, G., Smith, W.B., Nguyen, N., Jiang, C. & Schuman, E.M. 2001, "Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons", *Neuron*, vol. 30, no. 2, pp. 489-502.
- Ainger, K., Avossa, D., Diana, A.S., Barry, C., Barbarese, E. & Carson, J.H. 1997, "Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA", *The Journal of cell biology*, vol. 138, no. 5, pp. 1077-1087.
- Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S.J., Barry, C., Barbarese, E. & Carson, J.H. 1993, "Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes", *The Journal of cell biology*, vol. 123, no. 2, pp. 431-441.
- Akbarzadeh, S., Ji, H., Frecklington, D., Marmy-Conus, N., Mok, Y.F., Bowes, L., Devereux, L., Linsenmeyer, M., Simpson, R.J. & Dorow, D.S. 2002, "Mixed lineage kinase 2 interacts with clathrin and influences clathrin-coated vesicle trafficking", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 39, pp. 36280-36287.
- Alam, M.R., Caldwell, B.D., Johnson, R.C., Darlington, D.N., Mains, R.E. & Eipper, B.A. 1996, "Novel proteins that interact with the COOH-terminal cytosolic routing determinants of an integral membrane peptide-processing enzyme", *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 45, pp. 28636-28640.
- Alvarez, J., Giuditta, A. & Koenig, E. 2000, "Protein synthesis in axons and terminals: significance for maintenance, plasticity and regulation of phenotype. With a critique of slow transport theory", *Progress in neurobiology*, vol. 62, no. 1, pp. 1-62.
- Ally, S., Jolly, A.L. & Gelfand, V.I. 2008, "Motor-cargo release: CaMKII as a traffic cop", *Nature cell biology*, vol. 10, no. 1, pp. 3-5.
- Anderson, P. & Kedersha, N. 2009, "RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 10, no. 6, pp. 430-436.
- Anderson, P. & Kedersha, N. 2006, "RNA granules", *The Journal of cell biology*, vol. 172, no. 6, pp. 803-808.
- Antar, L.N., Afroz, R., Dichtenberg, J.B., Carroll, R.C. & Bassell, G.J. 2004, "Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 24, no. 11, pp. 2648-2655.
- Antar, L.N., Dichtenberg, J.B., Plociniak, M., Afroz, R. & Bassell, G.J. 2005, "Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons", *Genes, brain, and behavior*, vol. 4, no. 6, pp. 350-359.
- Apostol, B.L., Simmons, D.A., Zuccato, C., Illes, K., Pallos, J., Casale, M., Conforti, P., Ramos, C., Roarke, M., Kathuria, S., Cattaneo, E., Marsh, J.L. & Thompson, L.M. 2008, "CEP-1347 reduces mutant huntingtin-associated neurotoxicity and restores BDNF levels in R6/2 mice", *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 39, no. 1, pp. 8-20.

BIBLIOGRAFIA

- Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A. & Walker, M.D. 1993, "The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 17, pp. 8063-8067.
- Aronov, S., Aranda, G., Behar, L. & Ginzburg, I. 2002, "Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules", *Journal of cell science*, vol. 115, no. Pt 19, pp. 3817-3827.
- Atchley, W.R. & Fitch, W.M. 1997, "A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 10, pp. 5172-5176.
- Atlas, R., Behar, L., Sapoznik, S. & Ginzburg, I. 2007, "Dynamic association with polysomes during P19 neuronal differentiation and an untranslated-region-dependent translation regulation of the tau mRNA by the tau mRNA-associated proteins IMP1, HuD, and G3BP1", *Journal of neuroscience research*, vol. 85, no. 1, pp. 173-183.
- B**agni, C. 2008, "On BC1 RNA and the fragile X mental retardation protein", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 17, pp. E19.
- Baldassarre, G., Belletti, B., Nicoloso, M.S., Schiappacassi, M., Vecchione, A., Spessotto, P., Morrione, A., Canzonieri, V. & Colombatti, A. 2005, "p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion", *Cancer cell*, vol. 7, no. 1, pp. 51-63.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D. & Jones, E. 2011, "Alzheimer's disease", *Lancet*, vol. 377, no. 9770, pp. 1019-1031.
- Bardoni, B., Schenck, A. & Mandel, J.L. 1999, "A novel RNA-binding nuclear protein that interacts with the fragile X mental retardation (FMR1) protein", *Human molecular genetics*, vol. 8, no. 13, pp. 2557-2566.
- Bardoni, B., Willemsen, R., Weiler, I.J., Schenck, A., Severijnen, L.A., Hindelang, C., Lalli, E. & Mandel, J.L. 2003, "NUFIP1 (nuclear FMRP interacting protein 1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein associated with active synaptoneurosomes", *Experimental cell research*, vol. 289, no. 1, pp. 95-107.
- Baretino, D., Pombo, P.M., Espliguero, G. & Rodriguez-Pena, A. 1999, "The mouse neurotrophin receptor trkB gene is transcribed from two different promoters", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1446, no. 1-2, pp. 24-34.
- Barnard, D.C., Ryan, K., Manley, J.L. & Richter, J.D. 2004, "Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation", *Cell*, vol. 119, no. 5, pp. 641-651.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R.L. & Lipshitz, H.D. 1998, "RNA localization in development", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 67, pp. 335-394.
- Bassell, G.J. & Singer, R.H. 2001, "Neuronal RNA localization and the cytoskeleton", *Results and problems in cell differentiation*, vol. 34, pp. 41-56.
- Bassell, G.J., Zhang, H., Byrd, A.L., Femino, A.M., Singer, R.H., Taneja, K.L., Lifshitz, L.M., Herman, I.M. & Kosik, K.S. 1998, "Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 18, no. 1, pp. 251-265.

- Beckel-Mitchener, A.C., Miera, A., Keller, R. & Perrone-Bizzozero, N.I. 2002, "Poly(A) tail length-dependent stabilization of GAP-43 mRNA by the RNA-binding protein HuD", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 31, pp. 27996-28002.
- Bayly, R., Murase, T., Hyndman, B.D., Savage, R., Nurmohamed, S., Munro, K., Casselman, R., Smith, S.P. & LeBrun, D.P. 2006, "Critical role for a single leucine residue in leukemia induction by E2A-PBX1", *Molecular and cellular biology*, vol. 26, no. 17, pp. 6442-6452.
- Behar, L., Marx, R., Sadot, E., Barg, J. & Ginzburg, I. 1995, "cis-acting signals and trans-acting proteins are involved in tau mRNA targeting into neurites of differentiating neuronal cells", *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, vol. 13, no. 2, pp. 113-127.
- Ben Fredj, N., Grange, J., Sadoul, R., Richard, S., Goldberg, Y. & Boyer, V. 2004, "Depolarization-induced translocation of the RNA-binding protein Sam68 to the dendrites of hippocampal neurons", *Journal of cell science*, vol. 117, no. Pt 7, pp. 1079-1090.
- Besse, F. & Ephrussi, A. 2008, "Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 9, no. 12, pp. 971-980.
- Bieche, I., Manceau, V., Curmi, P.A., Laurendeau, I., Lachkar, S., Leroy, K., Vidaud, D., Sobel, A. & Maucuer, A. 2003, "Quantitative RT-PCR reveals a ubiquitous but preferentially neural expression of the KIS gene in rat and human", *Brain research.Molecular brain research*, vol. 114, no. 1, pp. 55-64.
- Bisson, N., Tremblay, M., Robinson, F., Kaplan, D.R., Trusko, S.P. & Moss, T. 2008, "Mice lacking both mixed-lineage kinase genes *Mlk1* and *Mlk2* retain a wild type phenotype", *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 7, no. 7, pp. 909-916.
- Blackwell, T.K. & Weintraub, H. 1990, "Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 250, no. 4984, pp. 1104-1110.
- Bock, B.C., Vacratsis, P.O., Qamirani, E. & Gallo, K.A. 2000, "Cdc42-induced activation of the mixed-lineage kinase SPRK *in vivo*. Requirement of the Cdc42/Rac interactive binding motif and changes in phosphorylation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 19, pp. 14231-14241.
- Boehm, M., Yoshimoto, T., Crook, M.F., Nallamshetty, S., True, A., Nabel, G.J. & Nabel, E.G. 2002, "A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression", *The EMBO journal*, vol. 21, no. 13, pp. 3390-3401.
- Boissiere, F., Faucheux, B., Ruberg, M., Agid, Y. & Hirsch, E.C. 1997, "Decreased TrkA gene expression in cholinergic neurons of the striatum and basal forebrain of patients with Alzheimer's disease", *Experimental neurology*, vol. 145, no. 1, pp. 245-252.
- Boulet, I., Fagard, R. & Fischer, S. 1987, "Correlation between phosphorylation and kinase activity of a tyrosine protein kinase: p56lck", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 149, no. 1, pp. 56-64.
- Bouzas-Rodriguez, J., Cabrera, J.R., Delloye-Bourgeois, C., Ichim, G., Delcros, J.G., Raquin, M.A., Rousseau, R., Combaret, V., Benard, J., Tauszig-Delamasure, S. & Mehlen, P. 2010, "Neurotrophin-3 production promotes

BIBLIOGRAFIA

- human neuroblastoma cell survival by inhibiting TrkC-induced apoptosis", *The Journal of clinical investigation*, vol. 120, no. 3, pp. 850-858.
- Bowman, A.B., Kamal, A., Ritchings, B.W., Philp, A.V., McGrail, M., Gindhart, J.G. & Goldstein, L.S. 2000, "Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the Sunday driver (SYD) protein", *Cell*, vol. 103, no. 4, pp. 583-594.
- Bramham, C.R. 2008, "Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation", *Current opinion in neurobiology*, vol. 18, no. 5, pp. 524-531.
- Bramham, C.R., Alme, M.N., Bittins, M., Kuipers, S.D., Nair, R.R., Pai, B., Panja, D., Schubert, M., Soule, J., Tiron, A. & Wibrand, K. 2010, "The Arc of synaptic memory", *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, vol. 200, no. 2, pp. 125-140.
- Bramham, C.R. & Messaoudi, E. 2005, "BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis", *Progress in neurobiology*, vol. 76, no. 2, pp. 99-125.
- Bramham, C.R. & Wells, D.G. 2007, "Dendritic mRNA: transport, translation and function", *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 8, no. 10, pp. 776-789.
- Bristow, G.C., Lane, T.A., Walker, M., Chen, L., Sei, Y., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., Harrison, P.J. & Eastwood, S.L. 2009, "Expression of kinase interacting with stathmin (KIS, UHMK1) in human brain and lymphoblasts: Effects of schizophrenia and genotype", *Brain research*, vol. 1301, pp. 197-206.
- Brodeur, G.M., Nakagawara, A., Yamashiro, D.J., Ikegaki, N., Liu, X.G., Azar, C.G., Lee, C.P. & Evans, A.E. 1997, "Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas", *Journal of neuro-oncology*, vol. 31, no. 1-2, pp. 49-55.
- Bromann, P.A., Korkaya, H. & Courtneidge, S.A. 2004, "The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases", *Oncogene*, vol. 23, no. 48, pp. 7957-7968.
- C**ajigas, I.J., Tushev, G., Will, T.J., Tom Dieck, S., Fuerst, N. & Schuman, E.M. 2012, "The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging", *Neuron*, vol. 74, no. 3, pp. 453-466.
- Cambray, S., Pedraza, N., Rafel, M., Gari, E., Aldea, M. & Gallego, C. 2009, "Protein kinase KIS localizes to RNA granules and enhances local translation", *Molecular and cellular biology*, vol. 29, no. 3, pp. 726-735.
- CAMBRAY CARNER, S. (2008). KIS: una quinasa implicada en traducción localizada de mRNAs en neuronas. C.Gallego González (dir.). Tesis Doctoral. Universitat de Lleida. Facultat de Medicina.
- Carlsson, Y., Leverin, A.L., Hedtjarn, M., Wang, X., Mallard, C. & Hagberg, H. 2009, "Role of mixed lineage kinase inhibition in neonatal hypoxia-ischemia", *Developmental neuroscience*, vol. 31, no. 5, pp. 420-426.
- Carson, J.H., Cui, H. & Barbarese, E. 2001, "The balance of power in RNA trafficking", *Current opinion in neurobiology*, vol. 11, no. 5, pp. 558-563.

- Chadee, D.N., Xu, D., Hung, G., Andalibi, A., Lim, D.J., Luo, Z., Gutmann, D.H. & Kyriakis, J.M. 2006, "Mixed-lineage kinase 3 regulates B-Raf through maintenance of the B-Raf/Raf-1 complex and inhibition by the NF2 tumor suppressor protein", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 12, pp. 4463-4468.
- Chae, J.H., Stein, G.H. & Lee, J.E. 2004, "NeuroD: the predicted and the surprising", *Molecules and cells*, vol. 18, no. 3, pp. 271-288.
- Chao, J.A., Patskovsky, Y., Patel, V., Levy, M., Almo, S.C. & Singer, R.H. 2010, "ZBP1 recognition of beta-actin zipcode induces RNA looping", *Genes & development*, vol. 24, no. 2, pp. 148-158.
- Chao, M.V. 2003, "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways", *Nature reviews.Neuroscience*, vol. 4, no. 4, pp. 299-309.
- Chen, A.I., Nguyen, C.N., Copenhagen, D.R., Badurek, S., Minichiello, L., Ranscht, B. & Reichardt, L.F. 2011, "TrkB (tropomyosin-related kinase B) controls the assembly and maintenance of GABAergic synapses in the cerebellar cortex", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 31, no. 8, pp. 2769-2780.
- Cho, Y.Y., Bode, A.M., Mizuno, H., Choi, B.Y., Choi, H.S. & Dong, Z. 2004, "A novel role for mixed-lineage kinase-like mitogen-activated protein triple kinase alpha in neoplastic cell transformation and tumor development", *Cancer research*, vol. 64, no. 11, pp. 3855-3864.
- Cohen-Cory, S., Kidane, A.H., Shirkey, N.J. & Marshak, S. 2010, "Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity", *Developmental neurobiology*, vol. 70, no. 5, pp. 271-288.
- Conforti, P., Ramos, C., Apostol, B.L., Simmons, D.A., Nguyen, H.P., Riess, O., Thompson, L.M., Zuccato, C. & Cattaneo, E. 2008, "Blood level of brain-derived neurotrophic factor mRNA is progressively reduced in rodent models of Huntington's disease: restoration by the neuroprotective compound CEP-1347", *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 39, no. 1, pp. 1-7.
- Costa-Mattioli, M., Sossin, W.S., Klann, E. & Sonenberg, N. 2009, "Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory", *Neuron*, vol. 61, no. 1, pp. 10-26.
- Cunha, C., Brambilla, R. & Thomas, K.L. 2010, "A simple role for BDNF in learning and memory?", *Frontiers in molecular neuroscience*, vol. 3, pp. 1.
- Czaplinski, K. & Singer, R.H. 2006, "Pathways for mRNA localization in the cytoplasm", *Trends in biochemical sciences*, vol. 31, no. 12, pp. 687-693.
- D**arnell, J.C., Fraser, C.E., Mostovetsky, O., Stefani, G., Jones, T.A., Eddy, S.R. & Darnell, R.B. 2005, "Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes", *Genes & development*, vol. 19, no. 8, pp. 903-918.
- Darnell, J.C., Jensen, K.B., Jin, P., Brown, V., Warren, S.T. & Darnell, R.B. 2001, "Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function", *Cell*, vol. 107, no. 4, pp. 489-499.

BIBLIOGRAFIA

- Davies, C. & Tournier, C. 2012, "Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies", *Biochemical Society transactions*, vol. 40, no. 1, pp. 85-89.
- Davis, L., Banker, G.A. & Steward, O. 1987, "Selective dendritic transport of RNA in hippocampal neurons in culture", *Nature*, vol. 330, no. 6147, pp. 477-479.
- Danzer, S.C., Kotloski, R.J., Walter, C., Hughes, M. & McNamara, J.O. 2008, "Altered morphology of hippocampal dentate granule cell presynaptic and postsynaptic terminals following conditional deletion of TrkB", *Hippocampus*, vol. 18, no. 7, pp. 668-678.
- De Masi, F., Grove, C.A., Vedenko, A., Alibes, A., Gisselbrecht, S.S., Serrano, L., Bulyk, M.L. & Walhout, A.J. 2011, "Using a structural and logics systems approach to infer bHLH-DNA binding specificity determinants", *Nucleic acids research*, .
- De Rubeis, S. & Bagni, C. 2011, "Regulation of molecular pathways in the Fragile X Syndrome: insights into Autism Spectrum Disorders", *Journal of neurodevelopmental disorders*, vol. 3, no. 3, pp. 257-269.
- De Rubeis, S. & Bagni, C. 2010, "Fragile X mental retardation protein control of neuronal mRNA metabolism: Insights into mRNA stability", *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 43, no. 1, pp. 43-50.
- Deogracias, R., Espliguero, G., Iglesias, T. & Rodriguez-Pena, A. 2004, "Expression of the neurotrophin receptor trkB is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons", *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 26, no. 3, pp. 470-480.
- Derry, M.C., Yanagiya, A., Martineau, Y. & Sonenberg, N. 2006, "Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins", *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 71, pp. 537-543.
- Deshmukh, M. & Johnson, E.M., Jr 1997, "Programmed cell death in neurons: focus on the pathway of nerve growth factor deprivation-induced death of sympathetic neurons", *Molecular pharmacology*, vol. 51, no. 6, pp. 897-906.
- Dewachter, I., Ris, L., Croes, S., Borghgraef, P., Devijver, H., Voets, T., Nilius, B., Godaux, E. & Van Leuven, F. 2008, "Modulation of synaptic plasticity and Tau phosphorylation by wild-type and mutant presenilin1", *Neurobiology of aging*, vol. 29, no. 5, pp. 639-652.
- Dictenberg, J.B., Swanger, S.A., Antar, L.N., Singer, R.H. & Bassell, G.J. 2008, "A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome", *Developmental cell*, vol. 14, no. 6, pp. 926-939.
- Dong, X., Sweet, J., Challis, J.R., Brown, T. & Lye, S.J. 2007, "Transcriptional activity of androgen receptor is modulated by two RNA *splicing* factors, PSF and p54nrb", *Molecular and cellular biology*, vol. 27, no. 13, pp. 4863-4875.
- Doyle, M. & Kiebler, M.A. 2011, "Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging", *The EMBO journal*, vol. 30, no. 17, pp. 3540-3552.

- Dufton, C., Marcora, E., Chae, J.H., McCullough, J., Eby, J., Hausburg, M., Stein, G.H., Khoo, S., Cobb, M.H. & Lee, J.E. 2005, "Context-dependent regulation of NeuroD activity and protein accumulation", *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 28, no. 4, pp. 727-736.
- E**ckey, M., Tenbaum, S.P., Munoz, A. & Banihmad, A. 2003, "Mixed lineage kinase 2 enhances trans-repression of Alien and nuclear receptors", *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 213, no. 1, pp. 71-78.
- Eckner, R., Yao, T.P., Oldread, E. & Livingston, D.M. 1996, "Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation", *Genes & development*, vol. 10, no. 19, pp. 2478-2490.
- Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J.P., Rath, M. & Wagner, E.F. 2003, "Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53", *Cell*, vol. 112, no. 2, pp. 181-192.
- Eggert, D., Dash, P.K., Gorantla, S., Dou, H., Schifitto, G., Maggirwar, S.B., Dewhurst, S., Poluektova, L., Gelbard, H.A. & Gendelman, H.E. 2010, "Neuroprotective activities of CEP-1347 in models of neuroAIDS", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 184, no. 2, pp. 746-756.
- Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M. & Harrison, S.C. 1994, "Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer", *Genes & development*, vol. 8, no. 8, pp. 970-980.
- Elvira, G., Wasiak, S., Blandford, V., Tong, X.K., Serrano, A., Fan, X., del Rayo Sanchez-Carbente, M., Servant, F., Bell, A.W., Boismenu, D., Lacaille, J.C., McPherson, P.S., DesGroseillers, L. & Sossin, W.S. 2006, "Characterization of an RNA granule from developing brain", *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 5, no. 4, pp. 635-651.
- Emili, A., Shales, M., McCracken, S., Xie, W., Tucker, P.W., Kobayashi, R., Blencowe, B.J. & Ingles, C.J. 2002, "Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD", *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 8, no. 9, pp. 1102-1111.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C. & Comella, J.X. 2000, "Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells", *Journal of neurochemistry*, vol. 75, no. 3, pp. 991-1003.
- Eom, T., Antar, L.N., Singer, R.H. & Bassell, G.J. 2003, "Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 23, no. 32, pp. 10433-10444.
- Estus, S., Zaks, W.J., Freeman, R.S., Gruda, M., Bravo, R. & Johnson, E.M., Jr 1994, "Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-Jun as necessary for neuronal apoptosis", *The Journal of cell biology*, vol. 127, no. 6 Pt 1, pp. 1717-1727.
- F**eig, S. & Lipton, P. 1993, "Pairing the cholinergic agonist carbachol with patterned Schaffer collateral stimulation initiates protein synthesis in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites via a muscarinic, NMDA-dependent mechanism", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 13, no. 3, pp. 1010-1021.

BIBLIOGRAFIA

- Feng, Y., Absher, D., Eberhart, D.E., Brown, V., Malter, H.E. & Warren, S.T. 1997, "FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association", *Molecular cell*, vol. 1, no. 1, pp. 109-118.
- Ferre-D'Amare, A.R., Prendergast, G.C., Ziff, E.B. & Burley, S.K. 1993, "Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain", *Nature*, vol. 363, no. 6424, pp. 38-45.
- Firulli, A.B., Firulli, B.A., Wang, J., Rogers, R.H. & Conway, S.J. 2010, "Gene replacement strategies to test the functional redundancy of basic helix-loop-helix transcription factor", *Pediatric cardiology*, vol. 31, no. 3, pp. 438-448.
- Fusco, D., Accornero, N., Lavoie, B., Shenoy, S.M., Blanchard, J.M., Singer, R.H. & Bertrand, E. 2003, "Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells", *Current biology : CB*, vol. 13, no. 2, pp. 161-167.
- G**allo, K.A. & Johnson, G.L. 2002, "Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 3, no. 9, pp. 663-672.
- Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., Gerloff, D.L. & Earnshaw, W.C. 2004, "Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle", *The Journal of cell biology*, vol. 166, no. 2, pp. 179-191.
- Gelbard, H.A., Dewhurst, S., Maggirwar, S.B., Kiebal, M., Poleskaya, O. & Gendelman, H.E. 2010, "Rebuilding synaptic architecture in HIV-1 associated neurocognitive disease: a therapeutic strategy based on modulation of mixed lineage kinase", *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, vol. 7, no. 4, pp. 392-398.
- Giampietro, C., Luzzati, F., Gambarotta, G., Giacobini, P., Boda, E., Fasolo, A. & Perroteau, I. 2005, "Stathmin expression modulates migratory properties of GN-11 neurons *in vitro*", *Endocrinology*, vol. 146, no. 4, pp. 1825-1834.
- Gines, S., Bosch, M., Marco, S., Gavalda, N., Diaz-Hernandez, M., Lucas, J.J., Canals, J.M. & Alberch, J. 2006, "Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain", *The European journal of neuroscience*, vol. 23, no. 3, pp. 649-658.
- Giorgi, C. & Moore, M.J. 2007, "The nuclear nurture and cytoplasmic nature of localized mRNPs", *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 18, no. 2, pp. 186-193.
- Giorgi, C., Yeo, G.W., Stone, M.E., Katz, D.B., Burge, C., Turrigiano, G. & Moore, M.J. 2007, "The EJC factor eIF4AIII modulates synaptic strength and neuronal protein expression", *Cell*, vol. 130, no. 1, pp. 179-191.
- Gkogkas, C., Sonenberg, N. & Costa-Mattioli, M. 2010, "Translational control mechanisms in long-lasting synaptic plasticity and memory", *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 42, pp. 31913-31917.
- Gruppo, R. & Richter, J.D. 2009, "Translational control from head to tail", *Current opinion in cell biology*, vol. 21, no. 3, pp. 444-451.

- Handley, M.E., Rasaiyaah, J., Chain, B.M. & Katz, D.R. 2007, "Mixed lineage kinases (MLKs): a role in dendritic cells, inflammation and immunity?", *International journal of experimental pathology*, vol. 88, no. 2, pp. 111-126.
- Hardwick, J.S. & Sefton, B.M. 1995, "Activation of the Lck tyrosine protein kinase by hydrogen peroxide requires the phosphorylation of Tyr-394", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 10, pp. 4527-4531.
- Harguindey, S., Orive, G., Cacabelos, R., Hevia, E.M., de Otazu, R.D., Arranz, J.L. & Anitua, E. 2008, "An integral approach to the etiopathogenesis of human neurodegenerative diseases (HNDDs) and cancer. Possible therapeutic consequences within the frame of the trophic factor withdrawal syndrome (TFWS)", *Neuropsychiatric disease and treatment*, vol. 4, no. 6, pp. 1073-1084.
- Harris, C.A., Deshmukh, M., Tsui-Pierchala, B., Maroney, A.C. & Johnson, E.M., Jr 2002, "Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway by the mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 (KT7515) preserves metabolism and growth of trophic factor-deprived neurons", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 22, no. 1, pp. 103-113.
- Hayama, S., Daigo, Y., Yamabuki, T., Hirata, D., Kato, T., Miyamoto, M., Ito, T., Tsuchiya, E., Kondo, S. & Nakamura, Y. 2007, "Phosphorylation and activation of cell division cycle associated 8 by aurora kinase B plays a significant role in human lung carcinogenesis", *Cancer research*, vol. 67, no. 9, pp. 4113-4122.
- Hellard, D., Brosenitsch, T., Fritzsche, B. & Katz, D.M. 2004, "Cranial sensory neuron development in the absence of brain-derived neurotrophic factor in BDNF/Bax double null mice", *Developmental biology*, vol. 275, no. 1, pp. 34-43.
- Hengst, U., Deglincerti, A., Kim, H.J., Jeon, N.L. & Jaffrey, S.R. 2009, "Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein", *Nature cell biology*, vol. 11, no. 8, pp. 1024-1030.
- Hermey, G. 2009, "The Vps10p-domain receptor family", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 66, no. 16, pp. 2677-2689.
- Hieronimus, H. & Silver, P.A. 2004, "A systems view of mRNP biology", *Genes & development*, vol. 18, no. 23, pp. 2845-2860.
- Hirai, S., Katoh, M., Terada, M., Kyriakis, J.M., Zon, L.I., Rana, A., Avruch, J. & Ohno, S. 1997, "MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 24, pp. 15167-15173.
- Hirai, S., Kawaguchi, A., Hirasawa, R., Baba, M., Ohnishi, T. & Ohno, S. 2002, "MAPK-upstream protein kinase (MUK) regulates the radial migration of immature neurons in telencephalon of mouse embryo", *Development (Cambridge, England)*, vol. 129, no. 19, pp. 4483-4495.
- Hirokawa, N. 2006, "mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 26, no. 27, pp. 7139-7142.
- Hirokawa, N., Niwa, S. & Tanaka, Y. 2010, "Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease", *Neuron*, vol. 68, no. 4, pp. 610-638.

BIBLIOGRAFIA

- Hirokawa, N. & Takemura, R. 2005, "Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons", *Nature reviews.Neuroscience*, vol. 6, no. 3, pp. 201-214.
- Huang, E.J., Wilkinson, G.A., Farinas, I., Backus, C., Zang, K., Wong, S.L. & Reichardt, L.F. 1999, "Expression of Trk receptors in the developing mouse trigeminal ganglion: *in vivo* evidence for NT-3 activation of TrkA and TrkB in addition to TrkC", *Development (Cambridge, England)*, vol. 126, no. 10, pp. 2191-2203.
- Huang, Y.S., Carson, J.H., Barbarese, E. & Richter, J.D. 2003, "Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB", *Genes & development*, vol. 17, no. 5, pp. 638-653.
- Huang, Y.S., Jung, M.Y., Sarkissian, M. & Richter, J.D. 2002, "N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alpha CaMKII mRNA polyadenylation at synapses", *The EMBO journal*, vol. 21, no. 9, pp. 2139-2148.
- Huang, Y.S., Kan, M.C., Lin, C.L. & Richter, J.D. 2006, "CPEB3 and CPEB4 in neurons: analysis of RNA-binding specificity and translational control of AMPA receptor GluR2 mRNA", *The EMBO journal*, vol. 25, no. 20, pp. 4865-4876.
- Huang, Y.S. & Richter, J.D. 2004, "Regulation of local mRNA translation", *Current opinion in cell biology*, vol. 16, no. 3, pp. 308-313.
- Huang, Y.S. & Richter, J.D. 2007, "Analysis of mRNA translation in cultured hippocampal neurons", *Methods in enzymology*, vol. 431, pp. 143-162.
- Huang, Y.Z. & McNamara, J.O. 2010, "Mutual regulation of Src family kinases and the neurotrophin receptor TrkB", *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 11, pp. 8207-8217.
- Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dictenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J. & Singer, R.H. 2005, "Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1", *Nature*, vol. 438, no. 7067, pp. 512-515.
- I**avarone, A., Garg, P., Lasorella, A., Hsu, J. & Israel, M.A. 1994, "The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein", *Genes & development*, vol. 8, no. 11, pp. 1270-1284.
- J**elluma, N., Brenkman, A.B., van den Broek, N.J., Crujisen, C.W., van Osch, M.H., Lens, S.M., Medema, R.H. & Kops, G.J. 2008, "Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment", *Cell*, vol. 132, no. 2, pp. 233-246.
- Johnson, G.L. 2011, "Defining MAPK interactomes", *ACS chemical biology*, vol. 6, no. 1, pp. 18-20.
- Johnson, G.L. & Lapadat, R. 2002, "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 298, no. 5600, pp. 1911-1912.
- Johnson, S.E., Wang, X., Hardy, S., Taparowsky, E.J. & Konieczny, S.F. 1996, "Casein kinase II increases the transcriptional activities of MRF4 and MyoD independently of their direct phosphorylation", *Molecular and cellular biology*, vol. 16, no. 4, pp. 1604-1613.

- Jung, M.Y., Lorenz, L. & Richter, J.D. 2006, "Translational control by neuroguidin, a eukaryotic initiation factor 4E and CPEB binding protein", *Molecular and cellular biology*, vol. 26, no. 11, pp. 4277-4287.
- K**aech, S. & Banker, G. 2006, "Culturing hippocampal neurons", *Nature protocols*, vol. 1, no. 5, pp. 2406-2415.
- Kageyama, R., Ishibashi, M., Takebayashi, K. & Tomita, K. 1997, "bHLH transcription factors and mammalian neuronal differentiation", *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 29, no. 12, pp. 1389-1399.
- Kanai, Y., Dohmae, N. & Hirokawa, N. 2004, "Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule", *Neuron*, vol. 43, no. 4, pp. 513-525.
- Kaneko, S., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M. & Manley, J.L. 2007, "The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination", *Genes & development*, vol. 21, no. 14, pp. 1779-1789.
- Kang, H. & Schuman, E.M. 1996, "A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 273, no. 5280, pp. 1402-1406.
- Kanhema, T., Dagestad, G., Panja, D., Tiron, A., Messaoudi, E., Havik, B., Ying, S.W., Nairn, A.C., Sonenberg, N. & Bramham, C.R. 2006, "Dual regulation of translation initiation and peptide chain elongation during BDNF-induced LTP *in vivo*: evidence for compartment-specific translation control", *Journal of neurochemistry*, vol. 99, no. 5, pp. 1328-1337.
- Kant, S., Swat, W., Zhang, S., Zhang, Z.Y., Neel, B.G., Flavell, R.A. & Davis, R.J. 2011, "TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway", *Genes & development*, vol. 25, no. 19, pp. 2069-2078.
- Kao, D.I., Aldridge, G.M., Weiler, I.J. & Greenough, W.T. 2010, "Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 35, pp. 15601-15606.
- Katoh, M., Hirai, M., Sugimura, T. & Terada, M. 1995, "Cloning and characterization of MST, a novel (putative) serine/threonine kinase with SH3 domain", *Oncogene*, vol. 10, no. 7, pp. 1447-1451.
- Katsura, H., Obata, K., Mizushima, T., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M. & Noguchi, K. 2006, "Activation of Src-family kinases in spinal microglia contributes to mechanical hypersensitivity after nerve injury", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 26, no. 34, pp. 8680-8690.
- Kaur, H., Bekier, M.E. & Taylor, W.R. 2010, "Regulation of Borealin by phosphorylation at serine 219", *Journal of cellular biochemistry*, vol. 111, no. 5, pp. 1291-1298.
- Kee, B.L. 2009, "E and ID proteins branch out", *Nature reviews.Immunology*, vol. 9, no. 3, pp. 175-184.
- Khandjian, E.W., Tournier, B., Séguin, S., Tremblay, S., De Koninck, P. & Davidovic, L. 2009, "RNA Granules: Functions within Presynaptic Terminals and Postsynaptic Spines" in *Encyclopedia of Neuroscience*, ed. Editor-in-Chief: Larry R. Squire, Academic Press, Oxford, pp. 389-395.

BIBLIOGRAFIA

- Kiebler, M.A. & Bassell, G.J. 2006, "Neuronal RNA granules: movers and makers", *Neuron*, vol. 51, no. 6, pp. 685-690.
- Kiebler, M.A., Jansen, R.P., Dahm, R. & Macchi, P. 2005, "A putative nuclear function for mammalian Staufen", *Trends in biochemical sciences*, vol. 30, no. 5, pp. 228-231.
- Kielkopf, C.L., Lucke, S. & Green, M.R. 2004, "U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world", *Genes & development*, vol. 18, no. 13, pp. 1513-1526.
- Kim, H.K., Kim, Y.B., Kim, E.G. & Schuman, E. 2005, "Measurement of dendritic mRNA transport using ribosomal markers", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 328, no. 4, pp. 895-900.
- Kim, J.H. & Richter, J.D. 2006, "Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation", *Molecular cell*, vol. 24, no. 2, pp. 173-183.
- Kim, M., Bellini, M. & Ceman, S. 2009, "Fragile X mental retardation protein FMRP binds mRNAs in the nucleus", *Molecular and cellular biology*, vol. 29, no. 1, pp. 214-228.
- Kim, W.Y., Fritzschn, B., Serls, A., Bakel, L.A., Huang, E.J., Reichardt, L.F., Barth, D.S. & Lee, J.E. 2001, "NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development", *Development (Cambridge, England)*, vol. 128, no. 3, pp. 417-426.
- Kindler, S., Wang, H., Richter, D. & Tiedge, H. 2005, "RNA transport and local control of translation", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 21, pp. 223-245.
- King, A.M., Van der Put, E., Blomberg, B.B. & Riley, R.L. 2007, "Accelerated Notch-dependent degradation of E47 proteins in aged B cell precursors is associated with increased ERK MAPK activation", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 178, no. 6, pp. 3521-3529.
- Kingsbury, T.J., Murray, P.D., Bambrick, L.L. & Krueger, B.K. 2003, "Ca(2+)-dependent regulation of TrkB expression in neurons", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 42, pp. 40744-40748.
- Klann, E. & Dever, T.E. 2004, "Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity", *Nature reviews.Neuroscience*, vol. 5, no. 12, pp. 931-942.
- Knowles, R.B. & Kosik, K.S. 1997, "Neurotrophin-3 signals redistribute RNA in neurons", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 26, pp. 14804-14808.
- Knowles, R.B., Sabry, J.H., Martone, M.E., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Bassell, G.J. & Kosik, K.S. 1996, "Translocation of RNA granules in living neurons", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 16, no. 24, pp. 7812-7820.
- Knusel, B., Kaplan, D.R., Winslow, J.W., Rosenthal, A., Burton, L.E., Beck, K.D., Rabin, S., Nikolics, K. & Hefti, F. 1992, "K-252b selectively potentiates cellular actions and trk tyrosine phosphorylation mediated by neurotrophin-3", *Journal of neurochemistry*, vol. 59, no. 2, pp. 715-722.
- Kohrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C.G. & Kiebler, M.A. 1999, "Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent

- dendritic transport in living hippocampal neurons", *Molecular biology of the cell*, vol. 10, no. 9, pp. 2945-2953.
- Korb, E. & Finkbeiner, S. 2011, "Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior", *Trends in neurosciences*, .
- Kremerskothen, J., Kindler, S., Finger, I., Veltel, S. & Barnekow, A. 2006, "Postsynaptic recruitment of Dendrin depends on both dendritic mRNA transport and synaptic anchoring", *Journal of neurochemistry*, vol. 96, no. 6, pp. 1659-1666.
- Krichevsky, A.M. & Kosik, K.S. 2001, "Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation", *Neuron*, vol. 32, no. 4, pp. 683-696.
- Kristiansen, M., Hughes, R., Patel, P., Jacques, T.S., Clark, A.R. & Ham, J. 2010, "Mkp1 is a c-Jun target gene that antagonizes JNK-dependent apoptosis in sympathetic neurons", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 30, no. 32, pp. 10820-10832.
- Lacoux, C., Di Marino, D., Pilo-Boyl, P., Zalfa, F., Yan, B., Ciotti, M.T., Falconi, M., Urlaub, H., Achsel, T., Mougín, A., Caizergues-Ferrer, M. & Bagni, C. 2012, "BC1-FMRP interaction is modulated by 2'-O-methylation: RNA-binding activity of the tudor domain and translational regulation at synapses", *Nucleic acids research*, .
- Lai, D., Sakkas, D. & Huang, Y. 2006, "The fragile X mental retardation protein interacts with a distinct mRNA nuclear export factor NXF2", *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 12, no. 8, pp. 1446-1449.
- Langenickel, T.H., Olive, M., Boehm, M., San, H., Crook, M.F. & Nabel, E.G. 2008, "KIS protects against adverse vascular remodeling by opposing stathmin-mediated VSMC migration in mice", *The Journal of clinical investigation*, vol. 118, no. 12, pp. 3848-3859.
- Lasorella, A., Iavarone, A. & Israel, M.A. 1996, "Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins", *Molecular and cellular biology*, vol. 16, no. 6, pp. 2570-2578.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E. & Moore, M.J. 2001, "The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay", *The EMBO journal*, vol. 20, no. 17, pp. 4987-4997.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K. & Hempstead, B.L. 2001, "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 294, no. 5548, pp. 1945-1948.
- Lej, L. & Parada, L.F. 2007, "Transcriptional regulation of Trk family neurotrophin receptors", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 64, no. 5, pp. 522-532.
- Lessmann, V., Gottmann, K. & Malsangio, M. 2003, "Neurotrophin secretion: current facts and future prospects", *Progress in neurobiology*, vol. 69, no. 5, pp. 341-374.
- Leung, I.W. & Lassam, N. 2001, "The kinase activation loop is the key to mixed lineage kinase-3 activation via both autophosphorylation and hematopoietic progenitor kinase 1 phosphorylation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 3, pp. 1961-1967.

BIBLIOGRAFIA

- Leung, I.W. & Lassam, N. 1998, "Dimerization via tandem leucine zippers is essential for the activation of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MLK-3", *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 49, pp. 32408-32415.
- Li, S., Kuhne, W.W., Kulharya, A., Hudson, F.Z., Ha, K., Cao, Z. & Dynan, W.S. 2009, "Involvement of p54(nrb), a PSF partner protein, in DNA double-strand break repair and radioresistance", *Nucleic acids research*, vol. 37, no. 20, pp. 6746-6753.
- Li, Z., Zhang, Y., Ku, L., Wilkinson, K.D., Warren, S.T. & Feng, Y. 2001, "The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA", *Nucleic acids research*, vol. 29, no. 11, pp. 2276-2283.
- Lingbeck, J.M., Trausch-Azar, J.S., Ciechanover, A. & Schwartz, A.L. 2005, "E12 and E47 modulate cellular localization and proteasome-mediated degradation of MyoD and Id1", *Oncogene*, vol. 24, no. 42, pp. 6376-6384.
- Liu, Y., Encinas, M., Comella, J.X., Aldea, M. & Gallego, C. 2004, "Basic helix-loop-helix proteins bind to TrkB and p21(Cip1) promoters linking differentiation and cell cycle arrest in neuroblastoma cells", *Molecular and cellular biology*, vol. 24, no. 7, pp. 2662-2672.
- Liu, Y.F., Dorow, D. & Marshall, J. 2000, "Activation of MLK2-mediated signaling cascades by polyglutamine-expanded huntingtin", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 25, pp. 19035-19040.
- Livingstone, M., Atas, E., Meller, A. & Sonenberg, N. 2010, "Mechanisms governing the control of mRNA translation", *Physical biology*, vol. 7, no. 2, pp. 021001.
- Lluis, F., Ballestar, E., Suelves, M., Esteller, M. & Munoz-Canoves, P. 2005, "E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription", *The EMBO journal*, vol. 24, no. 5, pp. 974-984.
- Lu, B. 2003, "BDNF and activity-dependent synaptic modulation", *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, vol. 10, no. 2, pp. 86-98.
- Lu, R., Wang, H., Liang, Z., Ku, L., O'donnell, W.T., Li, W., Warren, S.T. & Feng, Y. 2004, "The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 42, pp. 15201-15206.
- Lu, Y., Christian, K. & Lu, B. 2008, "BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory?", *Neurobiology of learning and memory*, vol. 89, no. 3, pp. 312-323.
- Luedi, P.P., Dietrich, F.S., Weidman, J.R., Bosko, J.M., Jirtle, R.L. & Hartemink, A.J. 2007, "Computational and experimental identification of novel human imprinted genes", *Genome research*, vol. 17, no. 12, pp. 1723-1730.
- Luikart, B.W., Nef, S., Virmani, T., Lush, M.E., Liu, Y., Kavalali, E.T. & Parada, L.F. 2005, "TrkB has a cell-autonomous role in the establishment of hippocampal Schaffer collateral synapses", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 25, no. 15, pp. 3774-3786.

- Ma**, Y.C. & Huang, X.Y. 2002, "Novel regulation and function of Src tyrosine kinase", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 59, no. 3, pp. 456-462.
- Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C. & Kiebler, M.A. 2003, "Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 4, pp. 2100-2105.
- Manceau, V., Gavet, O., Curmi, P. & Sobel, A. 1999, "Stathmin interaction with HSC70 family proteins", *Electrophoresis*, vol. 20, no. 2, pp. 409-417.
- Manceau, V., Kielkopf, C.L., Sobel, A. & Maucuer, A. 2008, "Different requirements of the kinase and UHM domains of KIS for its nuclear localization and binding to *splicing* factors", *Journal of Molecular Biology*, vol. 381, no. 3, pp. 748-762.
- Manceau, V., Swenson, M., Le Caer, J.P., Sobel, A., Kielkopf, C.L. & Maucuer, A. 2006, "Major phosphorylation of SF1 on adjacent Ser-Pro motifs enhances interaction with U2AF65", *The FEBS journal*, vol. 273, no. 3, pp. 577-587.
- Marcora, E., Gowan, K. & Lee, J.E. 2003, "Stimulation of NeuroD activity by huntingtin and huntingtin-associated proteins HAP1 and MLK2", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 16, pp. 9578-9583.
- Maroney, A.C., Glicksman, M.A., Basma, A.N., Walton, K.M., Knight, E., Jr, Murphy, C.A., Bartlett, B.A., Finn, J.P., Angeles, T., Matsuda, Y., Neff, N.T. & Dionne, C.A. 1998, "Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 18, no. 1, pp. 104-111.
- Martin, K.C. & Ephrussi, A. 2009, "mRNA localization: gene expression in the spatial dimension", *Cell*, vol. 136, no. 4, pp. 719-730.
- Masaki, M., Ikeda, A., Shiraki, E., Oka, S. & Kawasaki, T. 2003, "Mixed lineage kinase LZK and antioxidant protein-1 activate NF-kappaB synergistically", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 270, no. 1, pp. 76-83.
- Massari, M.E., Jennings, P.A. & Murre, C. 1996, "The AD1 transactivation domain of E2A contains a highly conserved helix which is required for its activity in both *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells", *Molecular and cellular biology*, vol. 16, no. 1, pp. 121-129.
- Massari, M.E. & Murre, C. 2000, "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms", *Molecular and cellular biology*, vol. 20, no. 2, pp. 429-440.
- Mata, M., Merritt, S.E., Fan, G., Yu, G.G. & Holzman, L.B. 1996, "Characterization of dual leucine zipper-bearing kinase, a mixed lineage kinase present in synaptic terminals whose phosphorylation state is regulated by membrane depolarization via calcineurin", *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 28, pp. 16888-16896.
- Maucuer, A., Camonis, J.H. & Sobel, A. 1995, "Stathmin interaction with a putative kinase and coiled-coil-forming protein domains", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 8, pp. 3100-3104.

BIBLIOGRAFIA

- Maucuer, A., Le Caer, J.P., Manceau, V. & Sobel, A. 2000, "Specific Ser-Pro phosphorylation by the RNA-recognition motif containing kinase KIS", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 267, no. 14, pp. 4456-4464.
- Maucuer, A., Ozon, S., Manceau, V., Gavet, O., Lawler, S., Curmi, P. & Sobel, A. 1997, "KIS is a protein kinase with an RNA recognition motif", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 37, pp. 23151-23156.
- Mc Gee, M.M., Campiani, G., Ramunno, A., Nacci, V., Lawler, M., Williams, D.C. & Zisterer, D.M. 2002, "Activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential during PBOX-6-induced apoptosis in chronic myelogenous leukemia (CML) cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 21, pp. 18383-18389.
- Mehmood, R., Yasuhara, N., Oe, S., Nagai, M. & Yoneda, Y. 2009, "Synergistic nuclear import of NeuroD1 and its partner transcription factor, E47, via heterodimerization", *Experimental cell research*, vol. 315, no. 10, pp. 1639-1652.
- Melo, A., Monteiro, L., Lima, R.M., Oliveira, D.M., Cerqueira, M.D. & El-Bacha, R.S. 2011, "Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives", *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2011, pp. 467180.
- Mendez, R., Murthy, K.G., Ryan, K., Manley, J.L. & Richter, J.D. 2000, "Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex", *Molecular cell*, vol. 6, no. 5, pp. 1253-1259.
- Merritt, S.E., Mata, M., Nihalani, D., Zhu, C., Hu, X. & Holzman, L.B. 1999, "The mixed lineage kinase DLK utilizes MKK7 and not MKK4 as substrate", *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 15, pp. 10195-10202.
- Mikl, M., Vendra, G. & Kiebler, M.A. 2011, "Independent localization of MAP2, CaMKIIalpha and beta-actin RNAs in low copy numbers", *EMBO reports*, vol. 12, no. 10, pp. 1077-1084.
- Minichiello, L. 2009, "TrkB signalling pathways in LTP and learning", *Nature reviews.Neuroscience*, vol. 10, no. 12, pp. 850-860.
- Mishra, P., Senthivinayagam, S., Rangasamy, V., Sondarva, G. & Rana, B. 2010, "Mixed lineage kinase-3/JNK1 axis promotes migration of human gastric cancer cells following gastrin stimulation", *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, vol. 24, no. 3, pp. 598-607.
- Moore, K.B., Schneider, M.L. & Vetter, M.L. 2002, "Posttranslational mechanisms control the timing of bHLH function and regulate retinal cell fate", *Neuron*, vol. 34, no. 2, pp. 183-195.
- Morgan, M., Iaconcig, A. & Muro, A.F. 2010, "CPEB2, CPEB3 and CPEB4 are coordinately regulated by miRNAs recognizing conserved binding sites in paralog positions of their 3'-UTRs", *Nucleic acids research*, vol. 38, no. 21, pp. 7698-7710.
- Mota, M., Reeder, M., Chernoff, J. & Bazenet, C.E. 2001, "Evidence for a role of mixed lineage kinases in neuronal apoptosis", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 21, no. 14, pp. 4949-4957.

- Muddashetty, R.S., Nalavadi, V.C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., Warren, S.T. & Bassell, G.J. 2011, "Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling", *Molecular cell*, vol. 42, no. 5, pp. 673-688.
- Murre, C., McCaw, P.S. & Baltimore, D. 1989, "A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins", *Cell*, vol. 56, no. 5, pp. 777-783.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D. & Lassar, A.B. 1989, "Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence", *Cell*, vol. 58, no. 3, pp. 537-544.
- Murre, C., Voronova, A. & Baltimore, D. 1991, "B-cell- and myocyte-specific E2-box-binding factors contain E12/E47-like subunits", *Molecular and cellular biology*, vol. 11, no. 2, pp. 1156-1160.
- Muslimov, I.A., Santi, E., Homel, P., Perini, S., Higgins, D. & Tiedge, H. 1997, "RNA transport in dendrites: a cis-acting targeting element is contained within neuronal BC1 RNA", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 17, no. 12, pp. 4722-4733.
- N**agappan, G. & Lu, B. 2005, "Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications", *Trends in neurosciences*, vol. 28, no. 9, pp. 464-471.
- Nagata, K., Puls, A., Futter, C., Aspenstrom, P., Schaefer, E., Nakata, T., Hirokawa, N. & Hall, A. 1998, "The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3", *The EMBO journal*, vol. 17, no. 1, pp. 149-158.
- Nakamura, S., Okinaka, K., Hirano, I., Ono, T., Sugimoto, Y., Shigeno, K., Fujisawa, S., Shinjo, K. & Ohnishi, K. 2008, "KIS induces proliferation and the cell cycle progression through the phosphorylation of p27Kip1 in leukemia cells", *Leukemia research*, vol. 32, no. 9, pp. 1358-1365.
- Napoli, I., Mercurio, V., Boyd, P.P., Eleuteri, B., Zalfa, F., De Rubeis, S., Di Marino, D., Mohr, E., Massimi, M., Falconi, M., Witke, W., Costa-Mattioli, M., Sonenberg, N., Achsel, T. & Bagni, C. 2008, "The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP", *Cell*, vol. 134, no. 6, pp. 1042-1054.
- Narayanan, U., Nalavadi, V., Nakamoto, M., Thomas, G., Ceman, S., Bassell, G.J. & Warren, S.T. 2008, "S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 27, pp. 18478-18482.
- Narayanan, U., Nalavadi, V., Nakamoto, M., Pallas, D.C., Ceman, S., Bassell, G.J. & Warren, S.T. 2007, "FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 27, no. 52, pp. 14349-14357.
- Naya, F.J., Stellrecht, C.M. & Tsai, M.J. 1995, "Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor", *Genes & development*, vol. 9, no. 8, pp. 1009-1019.
- Neufeld, B., Grosse-Wilde, A., Hoffmeyer, A., Jordan, B.W., Chen, P., Dinev, D., Ludwig, S. & Rapp, U.R. 2000, "Serine/Threonine kinases 3pK and MAPK-activated protein kinase 2 interact with the basic helix-loop-helix

BIBLIOGRAFIA

- transcription factor E47 and repress its transcriptional activity", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 27, pp. 20239-20242.
- Nie, L., Xu, M., Vladimirova, A. & Sun, X.H. 2003, "Notch-induced E2A ubiquitination and degradation are controlled by MAP kinase activities", *The EMBO journal*, vol. 22, no. 21, pp. 5780-5792.
- Niere, F., Wilkerson, J.R. & Huber, K.M. 2012, "Evidence for a fragile X mental retardation protein-mediated translational switch in metabotropic glutamate receptor-triggered Arc translation and long-term depression", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 32, no. 17, pp. 5924-5936.
- Nikoletopoulou, V., Lickert, H., Frade, J.M., Rencurel, C., Giallonardo, P., Zhang, L., Bibel, M. & Barde, Y.A. 2010, "Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not", *Nature*, vol. 467, no. 7311, pp. 59-63.
- Norton, J.D. 2000, "ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis", *Journal of cell science*, vol. 113 (Pt 22), no. Pt 22, pp. 3897-3905.
- Norton, J.D., Deed, R.W., Craggs, G. & Sablitzky, F. 1998, "Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation", *Trends in cell biology*, vol. 8, no. 2, pp. 58-65.
- O**e, S. & Yoneda, Y. 2010, "Cytoplasmic polyadenylation element-like sequences are involved in dendritic targeting of BDNF mRNA in hippocampal neurons", *FEBS letters*, vol. 584, no. 15, pp. 3424-3430.
- Ola, A., Kerkela, R., Tokola, H., Pikkarainen, S., Skoumal, R., Vuolteenaho, O. & Ruskoaho, H. 2010, "The mixed-lineage kinase 1-3 signalling pathway regulates stress response in cardiac myocytes via GATA-4 and AP-1 transcription factors", *British journal of pharmacology*, vol. 159, no. 3, pp. 717-725.
- Osterweil, E.K., Krueger, D.D., Reinhold, K. & Bear, M.F. 2010, "Hypersensitivity to mGluR5 and ERK1/2 leads to excessive protein synthesis in the hippocampus of a mouse model of fragile X syndrome", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 30, no. 46, pp. 15616-15627.
- P**age, J.L., Wang, X., Sordillo, L.M. & Johnson, S.E. 2004, "MEKK1 signaling through p38 leads to transcriptional inactivation of E47 and repression of skeletal myogenesis", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 30, pp. 30966-30972.
- Palacios, I.M., Gatfield, D., St Johnston, D. & Izaurralde, E. 2004, "An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay", *Nature*, vol. 427, no. 6976, pp. 753-757.
- Park, S., Park, J.M., Kim, S., Kim, J.A., Shepherd, J.D., Smith-Hicks, C.L., Chowdhury, S., Kaufmann, W., Kuhl, D., Ryazanov, A.G., Haganir, R.L., Linden, D.J. & Worley, P.F. 2008, "Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD", *Neuron*, vol. 59, no. 1, pp. 70-83.
- Parkinson Study Group PRECEPT Investigators 2007, "Mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease", *Neurology*, vol. 69, no. 15, pp. 1480-1490.

- Pavlopoulos, E., Trifilieff, P., Chevalayre, V., Fioriti, L., Zairis, S., Pagano, A., Malleret, G. & Kandel, E.R. 2011, "Neuralized1 activates CPEB3: a function for nonproteolytic ubiquitin in synaptic plasticity and memory storage", *Cell*, vol. 147, no. 6, pp. 1369-1383.
- Pedraza, N., Rafel, M., Navarro, I., Encinas, M., Aldea, M. & Gallego, C. 2009, "Mixed lineage kinase phosphorylates transcription factor E47 and inhibits TrkB expression to link neuronal death and survival pathways", *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 47, pp. 32980-32988.
- Petrovic, V., Costa, R.H., Lau, L.F., Raychaudhuri, P. & Tyner, A.L. 2008, "FoxM1 regulates growth factor-induced expression of kinase-interacting stathmin (KIS) to promote cell cycle progression", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 1, pp. 453-460.
- Peverali, F.A., Ramqvist, T., Saffrich, R., Pepperkok, R., Barone, M.V. & Philipson, L. 1994, "Regulation of G1 progression by E2A and Id helix-loop-helix proteins", *The EMBO journal*, vol. 13, no. 18, pp. 4291-4301.
- Phelan, D.R., Loveland, K.L., Devereux, L. & Dorow, D.S. 1999, "Expression of mixed lineage kinase 2 in germ cells of the testis", *Molecular reproduction and development*, vol. 52, no. 2, pp. 135-140.
- Phelan, D.R., Price, G., Liu, Y.F. & Dorow, D.S. 2001, "Activated JNK phosphorylates the c-terminal domain of MLK2 that is required for MLK2-induced apoptosis", *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 14, pp. 10801-10810.
- Poon, M.M. & Martin, K.C. 2009, "Translational Regulation at the Synapse" in *Encyclopedia of Neuroscience*, ed. Editor-in-Chief: Larry R. Squire, Academic Press, Oxford, pp. 1135-1139.
- Pombo, P.M., Baretino, D., Espliguero, G., Metsis, M., Iglesias, T. & Rodriguez-Pena, A. 2000, "Transcriptional repression of neurotrophin receptor trkB by thyroid hormone in the developing rat brain", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 48, pp. 37510-37517.
- Prabhu, S., Ignatova, A., Park, S.T. & Sun, X.H. 1997, "Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins", *Molecular and cellular biology*, vol. 17, no. 10, pp. 5888-5896.
- Q**iu, Y., Sharma, A. & Stein, R. 1998, "P300 Mediates Transcriptional Stimulation by the Basic Helix-Loop-Helix Activators of the Insulin Gene", *Molecular and cellular biology*, vol. 18, no. 5, pp. 2957-2964.
- Quong, M.W., Massari, M.E., Zwart, R. & Murre, C. 1993, "A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells", *Molecular and cellular biology*, vol. 13, no. 2, pp. 792-800.
- R**ichter, J.D. 2010, "Translational control of synaptic plasticity", *Biochemical Society transactions*, vol. 38, no. 6, pp. 1527-1530.
- Richter, J.D. 2007, "CPEB: a life in translation", *Trends in biochemical sciences*, vol. 32, no. 6, pp. 279-285.
- Richter, J.D. & Klann, E. 2009, "Making synaptic plasticity and memory last: mechanisms of translational regulation", *Genes & development*, vol. 23, no. 1, pp. 1-11.

BIBLIOGRAFIA

- Richter, J.D. & Sonenberg, N. 2005, "Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins", *Nature*, vol. 433, no. 7025, pp. 477-480.
- Righi, M., Tongiorgi, E. & Cattaneo, A. 2000, "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces dendritic targeting of BDNF and tyrosine kinase B mRNAs in hippocampal neurons through a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 20, no. 9, pp. 3165-3174.
- Robinson, G.L., Henderson, E., Massari, M.E., Murre, C. & Stein, R. 1995, "c-Jun inhibits insulin control element-mediated transcription by affecting the transactivation potential of the E2A gene products", *Molecular and cellular biology*, vol. 15, no. 3, pp. 1398-1404.
- Rodger, J. & Frost, D.O. 2009, "Effects of trkB knockout on topography and ocular segregation of uncrossed retinal projections", *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, vol. 195, no. 1, pp. 35-44.
- Ross, S.E., Greenberg, M.E. & Stiles, C.D. 2003, "Basic helix-loop-helix factors in cortical development", *Neuron*, vol. 39, no. 1, pp. 13-25.
- Rutherford, M.N. & LeBrun, D.P. 1998, "Restricted expression of E2A protein in primary human tissues correlates with proliferation and differentiation", *The American journal of pathology*, vol. 153, no. 1, pp. 165-173.
- Ryazanov, A.G., Shestakova, E.A. & Natapov, P.G. 1988, "Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation", *Nature*, vol. 334, no. 6178, pp. 170-173.
- S**alton, M., Lerenthal, Y., Wang, S.Y., Chen, D.J. & Shiloh, Y. 2010, "Involvement of Matrin 3 and SFPQ/NONO in the DNA damage response", *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 9, no. 8, pp. 1568-1576.
- Santos, A.R., Comprido, D. & Duarte, C.B. 2010, "Regulation of local translation at the synapse by BDNF", *Progress in neurobiology*, vol. 92, no. 4, pp. 505-516.
- Saporito, M.S., Brown, E.M., Miller, M.S. & Carswell, S. 1999, "CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons *In vivo*", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 288, no. 2, pp. 421-427.
- Sasaki, Y., Welshhans, K., Wen, Z., Yao, J., Xu, M., Goshima, Y., Zheng, J.Q. & Bassell, G.J. 2010, "Phosphorylation of zipcode binding protein 1 is required for brain-derived neurotrophic factor signaling of local beta-actin synthesis and growth cone turning", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 30, no. 28, pp. 9349-9358.
- Schimmang, T., Tan, J., Muller, M., Zimmermann, U., Rohbock, K., Kopschall, I., Limberger, A., Minichiello, L. & Knipper, M. 2003, "Lack of Bdnf and TrkB signalling in the postnatal cochlea leads to a spatial reshaping of innervation along the tonotopic axis and hearing loss", *Development (Cambridge, England)*, vol. 130, no. 19, pp. 4741-4750.
- Schratt, G.M., Nigh, E.A., Chen, W.G., Hu, L. & Greenberg, M.E. 2004, "BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway

- during neuronal development", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 24, no. 33, pp. 7366-7377.
- Schuman, E.M., Dynes, J.L. & Steward, O. 2006, "Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 26, no. 27, pp. 7143-7146.
- Schutt, J., Falley, K., Richter, D., Kreienkamp, H.J. & Kindler, S. 2009, "Fragile X mental retardation protein regulates the levels of scaffold proteins and glutamate receptors in postsynaptic densities", *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 38, pp. 25479-25487.
- Schwid, S.R., Bausch, J., Oakes, D., Schuchter, L., Tanner, C., Forrest, M., Lang, A.E., Shoulson, I., PSG PRECEPT Investigators, Shoulson, I., Hyson, C., Oakes, D., FLAGg, E., Rudolph, A., Kieburz, K., Lang, A., Fahn, S., Gauger, L. & Goetz, C. 2010, "Cancer incidence in a trial of an antiapoptotic agent for Parkinson's disease", *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, vol. 25, no. 12, pp. 1801-1808.
- Shiama, N. 1997, "The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin", *Trends in cell biology*, vol. 7, no. 6, pp. 230-236.
- Shiina, N., Shinkura, K. & Tokunaga, M. 2005, "A novel RNA-binding protein in neuronal RNA granules: regulatory machinery for local translation", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 25, no. 17, pp. 4420-4434.
- Slattery, C., Ryan, M.P. & McMorro, T. 2008, "E2A proteins: regulators of cell phenotype in normal physiology and disease", *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 40, no. 8, pp. 1431-1436.
- Sloan, S.R., Shen, C.P., McCarrick-Walmsley, R. & Kadesch, T. 1996, "Phosphorylation of E47 as a potential determinant of B-cell-specific activity", *Molecular and cellular biology*, vol. 16, no. 12, pp. 6900-6908.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D.A., Birrer, M. & Karin, M. 1991, "Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73", *Nature*, vol. 354, no. 6353, pp. 494-496.
- Song, W., Volosin, M., Cragnolini, A.B., Hempstead, B.L. & Friedman, W.J. 2010, "ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 30, no. 46, pp. 15608-15615.
- Sossin, W.S. & Lacaille, J.C. 2010, "Mechanisms of translational regulation in synaptic plasticity", *Current opinion in neurobiology*, vol. 20, no. 4, pp. 450-456.
- Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., de Moor, C.H., Mendez, R. & Richter, J.D. 1999, "Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E", *Molecular cell*, vol. 4, no. 6, pp. 1017-1027.
- Steward, O. & Levy, W.B. 1982, "Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 2, no. 3, pp. 284-291.
- Stoilov, P., Castren, E. & Stamm, S. 2002, "Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 290, no. 3, pp. 1054-1065.

BIBLIOGRAFIA

- Sutton, M.A. & Schuman, E.M. 2006, "Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory", *Cell*, vol. 127, no. 1, pp. 49-58.
- Sutton, M.A. & Schuman, E.M. 2005, "Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity", *Journal of neurobiology*, vol. 64, no. 1, pp. 116-131.
- Swanger, S.A. & Bassell, G.J. 2011, "Making and breaking synapses through local mRNA regulation", *Current opinion in genetics & development*, vol. 21, no. 4, pp. 414-421.
- Swenson, K.I., Winkler, K.E. & Means, A.R. 2003, "A new identity for MLK3 as an NIMA-related, cell cycle-regulated kinase that is localized near centrosomes and influences microtubule organization", *Molecular biology of the cell*, vol. 14, no. 1, pp. 156-172.
- T**akagaki, Y. & Manley, J.L. 2000, "Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component", *Molecular and cellular biology*, vol. 20, no. 5, pp. 1515-1525.
- Takekawa, M., Tatebayashi, K. & Saito, H. 2005, "Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases", *Molecular cell*, vol. 18, no. 3, pp. 295-306.
- Takeuchi, M., Hata, Y., Hirao, K., Toyoda, A., Irie, M. & Takai, Y. 1997, "SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 18, pp. 11943-11951.
- Tamanini, F., Bontekoe, C., Bakker, C.E., van Unen, L., Anar, B., Willemsen, R., Yoshida, M., Galjaard, H., Oostra, B.A. & Hoogeveen, A.T. 1999, "Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations", *Human molecular genetics*, vol. 8, no. 5, pp. 863-869.
- Tcherkezian, J., Brittis, P.A., Thomas, F., Roux, P.P. & Flanagan, J.G. 2010, "Transmembrane receptor DCC associates with protein synthesis machinery and regulates translation", *Cell*, vol. 141, no. 4, pp. 632-644.
- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.Y., Lee, F.S., Kraemer, R.T., Nykjaer, A. & Hempstead, B.L. 2005, "ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 25, no. 22, pp. 5455-5463.
- Teramoto, H., Coso, O.A., Miyata, H., Igishi, T., Miki, T. & Gutkind, J.S. 1996, "Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family", *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 44, pp. 27225-27228.
- Thomas, S.M. & Brugge, J.S. 1997, "Cellular functions regulated by Src family kinases", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 13, pp. 513-609.
- Tien, A.C., Lin, M.H., Su, L.J., Hong, Y.R., Cheng, T.S., Lee, Y.C., Lin, W.J., Still, I.H. & Huang, C.Y. 2004, "Identification of the substrates and interaction proteins of aurora kinases from a protein-protein interaction model", *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 3, no. 1, pp. 93-104.
- Tiruchinapalli, D.M., Oleynikov, Y., Kelic, S., Shenoy, S.M., Hartley, A., Stanton, P.K., Singer, R.H. & Bassell, G.J. 2003, "Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin

- mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 23, no. 8, pp. 3251-3261.
- Turjanski, A.G., Vaque, J.P. & Gutkind, J.S. 2007, "MAP kinases and the control of nuclear events", *Oncogene*, vol. 26, no. 22, pp. 3240-3253.
- U**gai, H., Uchida, K., Kawasaki, H. & Yokoyama, K.K. 1999, "The coactivators p300 and CBP have different functions during the differentiation of F9 cells", *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, vol. 77, no. 6, pp. 481-494.
- Usardi, A., Pooler, A.M., Seereeram, A., Reynolds, C.H., Derkinderen, P., Anderton, B., Hanger, D.P., Noble, W. & Williamson, R. 2011, "Tyrosine phosphorylation of tau regulates its interactions with Fyn SH2 domains, but not SH3 domains, altering the cellular localization of tau", *The FEBS journal*, vol. 278, no. 16, pp. 2927-2937.
- V**acratsis, P.O. & Gallo, K.A. 2000, "Zipper-mediated oligomerization of the mixed lineage kinase SPRK/MLK-3 is not required for its activation by the GTPase cdc 42 but is necessary for its activation of the JNK pathway. Monomeric SPRK L410P does not catalyze the activating phosphorylation of Thr258 of murine MITOGEN-ACTIVATED protein kinase kinase 4", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 36, pp. 27893-27900.
- Vacratsis, P.O., Phinney, B.S., Gage, D.A. & Gallo, K.A. 2002, "Identification of *in vivo* phosphorylation sites of MLK3 by mass spectrometry and phosphopeptide mapping", *Biochemistry*, vol. 41, no. 17, pp. 5613-5624.
- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. & Angel, P. 1995, "ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-Jun induction in response to genotoxic agents", *The EMBO journal*, vol. 14, no. 8, pp. 1798-1811.
- W**agner, E.F. & Nebreda, A.R. 2009, "Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development", *Nature reviews.Cancer*, vol. 9, no. 8, pp. 537-549.
- Walker, F.O. 2007, "Huntington's disease", *Lancet*, vol. 369, no. 9557, pp. 218-228.
- Wan, Y., Feng, G. & Calakos, N. 2011, "Sapap3 deletion causes mGluR5-dependent silencing of AMPAR synapses", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 31, no. 46, pp. 16685-16691.
- Wang, C., Tao, Y., Wang, Y. & Xu, Z. 2010, "Regulation of the protein stability of POSH and MLK family", *Protein & cell*, vol. 1, no. 9, pp. 871-878.
- Wang, D.O., Martin, K.C. & Zukin, R.S. 2010, "Spatially restricting gene expression by local translation at synapses", *Trends in neurosciences*, vol. 33, no. 4, pp. 173-182.
- Wang, L.H., Besirli, C.G. & Johnson, E.M., Jr 2004, "Mixed-lineage kinases: a target for the prevention of neurodegeneration", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 44, pp. 451-474.
- Wang, L.H. & Johnson, E.M., Jr 2008, "Mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease", *Neurology*, vol. 71, no. 6, pp. 462; author reply 462-3.

BIBLIOGRAFIA

- Wang, L.H., Paden, A.J. & Johnson, E.M., Jr 2005, "Mixed-lineage kinase inhibitors require the activation of Trk receptors to maintain long-term neuronal trophism and survival", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 312, no. 3, pp. 1007-1019.
- Wang, X.P. & Cooper, N.G. 2010, "Comparative in silico analyses of cpeb1-4 with functional predictions", *Bioinformatics and biology insights*, vol. 4, pp. 61-83.
- Weintraub, H., Dwarki, V.J., Verma, I., Davis, R., Hollenberg, S., Snider, L., Lassar, A. & Tapscott, S.J. 1991, "Muscle-specific transcriptional activation by MyoD", *Genes & development*, vol. 5, no. 8, pp. 1377-1386.
- Welshhans, K. & Bassell, G.J. 2011, "Netrin-1-induced local beta-actin synthesis and growth cone guidance requires zipcode binding protein 1", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 31, no. 27, pp. 9800-9813.
- Wennerberg, K., Ellerbroek, S.M., Liu, R.Y., Karnoub, A.E., Burridge, K. & Der, C.J. 2002, "RhoG signals in parallel with Rac1 and Cdc42", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 49, pp. 47810-47817.
- White, R., Gonsior, C., Bauer, N.M., Kramer-Albers, E.M., Luhmann, H.J. & Trotter, J. 2012, "Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNP) F Is a Novel Component of Oligodendroglial RNA Transport Granules Contributing to Regulation of Myelin Basic Protein (MBP) Synthesis", *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 3, pp. 1742-1754.
- Wu, L., Wells, D., Tay, J., Mendis, D., Abbott, M.A., Barnitt, A., Quinlan, E., Heynen, A., Fallon, J.R. & Richter, J.D. 1998, "CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses", *Neuron*, vol. 21, no. 5, pp. 1129-1139.
- X**u, B., Zang, K., Ruff, N.L., Zhang, Y.A., McConnell, S.K., Stryker, M.P. & Reichardt, L.F. 2000, "Cortical degeneration in the absence of neurotrophin signaling: dendritic retraction and neuronal loss after removal of the receptor TrkB", *Neuron*, vol. 26, no. 1, pp. 233-245.
- Xu, Z., Maroney, A.C., Dobrzanski, P., Kukekov, N.V. & Greene, L.A. 2001, "The MLK family mediates c-Jun N-terminal kinase activation in neuronal apoptosis", *Molecular and cellular biology*, vol. 21, no. 14, pp. 4713-4724.
- Y**ang, D.D., Kuan, C.Y., Whitmarsh, A.J., Rincon, M., Zheng, T.S., Davis, R.J., Rakic, P. & Flavell, R.A. 1997, "Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene", *Nature*, vol. 389, no. 6653, pp. 865-870.
- Yuan, J. & Yankner, B.A. 2000, "Apoptosis in the nervous system", *Nature*, vol. 407, no. 6805, pp. 802-809.
- Z**alfa, F., Eleuteri, B., Dickson, K.S., Mercaldo, V., De Rubeis, S., di Penta, A., Tabolacci, E., Chiurazzi, P., Neri, G., Grant, S.G. & Bagni, C. 2007, "A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability", *Nature neuroscience*, vol. 10, no. 5, pp. 578-587.
- Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B. & Bagni, C. 2003, "The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses", *Cell*, vol. 112, no. 3, pp. 317-327.

- Zarubin, T. & Han, J. 2005, "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway", *Cell research*, vol. 15, no. 1, pp. 11-18.
- Zhang, H. & Gallo, K.A. 2001, "Autoinhibition of mixed lineage kinase 3 through its Src homology 3 domain", *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 49, pp. 45598-45603.
- Zhang, H.L., Eom, T., Oleynikov, Y., Shenoy, S.M., Liebelt, D.A., Dichtenberg, J.B., Singer, R.H. & Bassell, G.J. 2001, "Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility", *Neuron*, vol. 31, no. 2, pp. 261-275.
- Zhang, H.L., Singer, R.H. & Bassell, G.J. 1999, "Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones", *The Journal of cell biology*, vol. 147, no. 1, pp. 59-70.
- Zhao, Z.S. & Manser, E. 2005, "PAK and other Rho-associated kinases-effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation", *The Biochemical journal*, vol. 386, no. Pt 2, pp. 201-214.
- Zhong, J., Zhang, T. & Bloch, L.M. 2006, "Dendritic mRNAs encode diversified functionalities in hippocampal pyramidal neurons", *BMC neuroscience*, vol. 7, pp. 17.
- Zukin, R.S., Richter, J.D. & Bagni, C. 2009, "Signals, synapses, and synthesis: how new proteins control plasticity", *Frontiers in neural circuits*, vol. 3, pp. 14.

ÍNDEX DE TAULES I

FIGURES

60. ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

Figura 1 Model de l'activació dels receptors Trk i p75.....	7
Figura 2. Vies BDNF–TrkB i BDNF-p75.....	8
Figura 3. Estructura conservada dels receptors Trk.....	11
Figura 4. Esquema de les proteïnes E i els seus dominis.....	17
Figura 5. Dominis conservats entre la família de la MLK.....	21
Figura 6. Model de la proteïna huntingtina com a bastida per la senyalització de NeuroD.....	26
Figura 7. L'expressió del Trk augmenta a l'afegir a les cèl·lules la CEP-11004.....	28
Figura 8. Construccions utilitzades en la purificació de proteïnes per doble afinitat a E47 (TAP, Tandem Affinity Purification) i proteïnes obtingudes.....	39
Figura 9. Interacció de la MLK2 amb l'E47 <i>in vivo</i>	42
Figura 10. Interacció de l'E47 i la NeuroD amb la MLK2 <i>in vivo</i>	43
Figura 11. L'activació de la via MLK2 provoca la fosforilació de l'E47 <i>in vivo</i>	44
Figura 12. Fosforilació de l'E47 <i>in vivo</i> en cèl·lules SH-SY5Y.....	45
Figura 13. Fosforilació de l'E47 per diferents formes truncades de la MLK2.....	45
Figura 14. Efecte de l'inhibidor CEP en la fosforilació de l'E47.....	46
Figura 15. Construccions de l'E47 per localitzar els residus fosforilables amb la MLK2.....	46
Figura 16. El domini d'activació AD2 de l'E47 es fosforila <i>in vivo</i> en presència de la MLK2 en residus S/T presents al motiu LH.....	47
Figura 17. Seqüència d'un possible <i>docking site</i> per a la MLK2 alineada amb llocs d'unió, ja descrits, d'altres substrats.....	48
Figura 18. Efectes de les mutacions puntuals dels aminoàcids serina o treonina a alanina en la fosforilació de l'E47 mitjançant MLK2.....	49
Figura 19. La inhibició de la via JNK no evita la fosforilació de l'E47 en presència de la MLK2 <i>in vivo</i>	51
Figura 20.....	53
Figura 21. La MLK2 inhibeix la transactivació de l'E47 sobre el promotor del TrkB però no sobre el promotor del p21.....	55
Figura 22. La repressió transcripcional sobre el promotor del TrkB per la MLK2 necessita els residus S/T identificats al motiu LH de l'E47.....	57
Figura 23. La MLK2 inhibeix l'expressió del TrkB en neurones granulars de cerebel de rata.....	58
Figura 24. La inhibició de l'E47 per part de les MLKs podria coordinar negativament les vies de mort o supervivència en neurones.....	67
Figura 25. Inici de traducció Cap-dependent en eucariotes.....	76
Figura 26. Model de transport i regulació de la traducció local de l'mRNA a les dendrites.....	78
Figura 27. Regulació de la traducció local de l'mRNA als cons de creixement axonal i en la morfogènesi de les espines sinàptiques.....	83
Figura 28. Representació dels diferents sistemes de bloqueig de la traducció per la CPEB, o la FMRP.....	90
Figura 29. Traducció dels mRNA dendrítics induïda pel BDNF.....	92
Figura 30. Anàlisi de la seqüència d'aminoàcids de la KIS de ratolí.....	94
Figura 31. La KIS colocalitza amb la NonO i la KIF3A en neurones diferenciades.....	97
Figura 32. Colocalització de la KIS amb RNA.....	97
Figura 33. L'activitat quinasa de la KIS és important per estimular la traducció dependent del 3'UTR de la β -actina.....	99
Figura 34. Associació de la KIS amb la KIF3A i mRNAs transportats per RNPs.....	109
Figura 35. Colocalització i associació de la KIS amb l'mRNA de β -actina en neurones corticals de ratolí.....	111
Figura 36. Seqüència consens de fosforilació dels seus substrats.....	112
Figura 37. Domini UHM d'interacció proteïna-proteïna.....	113
Figura 38. Interacció <i>in vivo</i> de la KIS amb possibles proteïnes diana de la KIS.....	117
Figura 39. La NUFIP1 i la Borealina es troben en fraccions cel·lulars enriquides en grànuls d'mRNA.....	119

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 40. Distribució de la KIS i de la NUFIP1 en neurones diferenciades.....	120
Figura 41. Esquema de la seqüència de NUFIP1. Anàlisi de la seqüència de la NUFIP1.	121
Figura 42. Fosforilació <i>in vitro</i> de possibles substrats de la KIS.....	122
Figura 43. La inhibició de l'expressió de la KIS i/o de la NUFIP1 produeix variacions en els nivells dels mRNAs de SAPAP2, Arc i MAPT.....	123
Figura 44. Anàlisi de l'autofosforilació de la KIS.. ..	125
Figura 45. Efecte de la inhibició de l'autofosforilació de la KIS en la fosforilació dels seus substrats.....	126
Figura 46. La KIS desnaturalitzada no es pot fosforilar per la GST-KIS.	126
Figura 47. Co-immunoprecipitació de la FLAG-KIS mutada en els residus importants per la seva autofosforilació amb alguns dels seus interactors.	127
Figura 48. Anàlisi de la seqüència de la KIS i fosforilació per la Src.	128
Figura 49. Fosforilació de la KIS per la quinasa Src.. ..	129
Figura 50. Fosforilació de la KIS per la quinasa Src i els seus efectes en les proteïnes diana de la KIS.	130
Figura 51. Efectes de la quinasa Src en l'activitat quinasa de la KIS sobre els seus substrats.....	130
Figura 52. Possible model de regulació traduccional a la sinapsi.....	145
Figura 53. Diferenciació neuronal de cèl·lules de neuroblasoma SH-SY5Y.....	155
Figura 54. Proteïna KIS purificada per electroforesi preparativa.. ..	165
Figura 55. Construccions utilitzades en la purificació de proteïnes per doble afinitat a l'E47 (TAP, Tandem Affinity Purification)	167
Taula 1. Principals proteïnes o mRNAs identificades en grànuls de transport de RNA	82
Taula 2. Criteris de cerca de proteïnes regulades per KIS en traducció localitzada.	114
Taula 3. Proteïnes que interaccionen amb KIS pel sistema de doble híbrid relacionades amb traducció localitzada o grànuls de RNA.....	115
Taula 4 . Vectors plasmídics i lentivirals utilitzats.	161
Taula 5. Anticossos usats per Immunofluorescència (IF) i western-blot (WB).....	170
Taula 6. Condicions de temps i temperatura per purificar les proteïnes marcades amb l'epítot GST o HIS en bacteris <i>E.Coli</i> BL21.	173
Taula 7. Sondes Taqman utilitzades per Real Time PCR (Applied Biosystems)	178

ANNEX

Mixed Lineage Kinase Phosphorylates Transcription Factor E47 and Inhibits TrkB Expression to Link Neuronal Death and Survival Pathways*

Received for publication, June 28, 2009, and in revised form, September 25, 2009. Published, JBC Papers in Press, September 28, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.038729

Neus Pedraza¹, Marta Rafel, Isis Navarro, Mario Encinas, Martí Aldea, and Carme Gallego²

From the Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, IRBLLEIDA, Universitat de Lleida, 25008 Lleida, Catalonia, Spain

E47 is a basic helix-loop-helix transcription factor involved in neuronal differentiation and survival. We had previously shown that the basic helix-loop-helix protein E47 binds to E-box sequences within the promoter of the TrkB gene and activates its transcription. Proper expression of the TrkB receptor plays a key role in development and function of the vertebrate nervous system, and altered levels of TrkB have been associated with important human diseases. Here we show that E47 interacts with MLK2, a mixed lineage kinase (MLK) involved in JNK-mediated activation of programmed cell death. MLK2 enhances phosphorylation of the AD2 activation domain of E47 *in vivo* in a JNK-independent manner and phosphorylates *in vitro* defined serine and threonine residues within a loop-helix structure of AD2 that also contains a putative MLK docking site. Although these residues are essential for MLK2-mediated inactivation of E47, inhibition of MLKs by CEP11004 causes up-regulation of TrkB at a transcriptional level in cerebellar granule neurons and differentiating neuroblastoma cells. These findings allow us to propose a novel mechanism by which MLK regulates TrkB expression through phosphorylation of an activation domain of E47. This molecular link would explain why MLK inhibitors not only prevent activation of cell death processes but also enhance cell survival signaling as a key aspect of their neuroprotective potential.

Basic helix-loop-helix (bHLH)³ proteins are transcription factors that regulate gene expression to promote cell differentiation and tissue-specific cellular functions (1). For instance, NeuroD and MyoD are tissue-specific bHLH proteins involved in neurogenesis and myogenesis, respectively (2, 3). These tissue-specific proteins form dimers with other ubiquitously expressed bHLH transcription factors called E proteins, which bind to the canonical E-box sequence CANNTG and include HEB, E2-2, and the E2A gene products E12 and E47 (1). The

formation of active heterodimers can be inhibited by overexpression of Id family members, which bind to and sequester E2A proteins into transcriptionally nonfunctional complexes (4). There are two activation domains within E12 and E47 proteins: AD1, which is found between amino acids 1 and 99 (5, 6), and AD2, which is between amino acids 325 and 432 (7). The AD2 domain contains a region between amino acids 345 and 408 consisting of a loop adjacent to an amphipathic α -helix, the loop-helix (LH) motif, which is conserved in yeast, *Drosophila*, and mammalian cells (7). c-Jun specifically represses the activity of the LH domain, and the selective recognition by c-Jun of this activation domain in pancreatic β cells suggests an important function of E2A proteins in regulating insulin control element-mediated expression (8). In addition, E2A transcriptional activity can be modulated by phosphorylation at different levels. It has been reported that phosphorylation status of E47 alters the DNA binding ability of E47 as homodimers or heterodimers in different cellular contexts (9–11). Thus, p38 MAPK has been described to phosphorylate E47 at Ser¹⁴⁰ and promote MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription (12). On the other hand, it has also been observed that MEKK1 (MAPK/ERK kinase kinase 1) signaling through p38 leads to transcriptional inactivation of E47 (13). In addition, Ser/Thr kinases 3pK and MAPK-activated protein kinase 2 have been shown to interact with E47 and repress its transcriptional activity (14). Finally, E47 proteasomal degradation is associated with increased ERK MAPK activity in aged B cell precursors (15, 16).

MLKs are a family of serine/threonine kinases, all of which act as mitogen-activated protein kinase kinase kinases (17). The name “mixed lineage kinases” derives from the fact that of the 11 conserved subdomains found in all protein kinases, domains 1–8 of the MLK proteins resemble serine/threonine kinases, whereas regions 9–11 share sequence similarity with those of tyrosine kinases, such as the fibroblast growth factor receptor and Src (17–19). Eight mammalian MLKs have been identified and categorized into three subfamilies on the basis of domain organization and sequence similarity: MLKs, dual leucine zipper-bearing kinases (DLKs), and zipper sterile α -motif kinases (ZAKs). However, MLK2, MLK3, DLK, and leucine zipper kinase (LZK) are the only MLKs that have been studied in any detail at a biochemical level (20–22). Although MLK3 and LZK are expressed widely, MLK2 and DLK are restricted to brain. MLK1–4 share a high degree of homology in the N-terminal 500 amino acids, which incorporate several functional domains: an SH3 domain, a kinase catalytic domain, two

* This work was supported by the Ministry of Science and Innovation of Spain, Consolider-Ingenio 2010, Fundació La Caixa, and the European Union (Fondo Europeo de Desarrollo Regional).

¹ Researcher of the Juan de la Cierva Program.

² To whom correspondence should be addressed: Montserrat Roig, 2, 25008 Lleida, Catalonia, Spain. Fax: 34-973702426; E-mail: carme.gallego@cmb.udl.cat.

³ The abbreviations used are: bHLH, basic helix-loop-helix; MLK, mixed lineage kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LH, loop-helix; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; CRIB, Cdc42/Rac interactive binding; aa, amino acid(s); TAP, tandem affinity purification; GST, glutathione S-transferase; MEF, mouse embryonic fibroblast; RA, retinoic acid; DTT, dithiothreitol.

leucine zippers, a proline-rich region, and the Cdc42/Rac interactive binding (CRIB) domain, which mediates binding to GTP-bound Cdc42 and Rac. In contrast to the N-terminal portion of these proteins, the C termini share little homology and vary greatly in size, possibly to mediate specificity and orchestrate interactions with various other proteins. MLKs are considered primarily as kinases that act upstream of JNKs. Nonetheless, mammalian MLK3 is localized to the centrosome, and its activity is enhanced during G₂/M phase transition, when the JNK pathway remains inactive (23). It has been reported that silencing MLK3 can block mitogen-stimulated B-Raf activation and prevent serum- or Ki-Ras-stimulated cell proliferation (24). In addition, MLK2 has been involved in modulation of NeuroD and Alien transcription factors (25, 26). Thus, MLKs may be involved in very different processes depending on the particular molecular context.

Little is known about the molecular effectors of MLK activity in response to external or internal inputs, but the available evidence suggests that the activity of MLK proteins is controlled by phosphorylation (27). The most striking feature of all MLK proteins is their ability to dimerize, and MLK3 autophosphorylates following homodimerization (27) via a mechanism analogous to that of receptor tyrosine kinases (with which MLKs share some sequence homology). Activation of MLK3 by Cdc42 and Rac has been shown to be a pathway for JNK activation by these G-proteins (28). Two Cdc42-inducible autophosphorylation sites in MLK3 have been identified, but it is unclear how Cdc42 induces MLK3 phosphorylation. One speculation was that the association of the CRIB domain with a GTP-bound G-protein would displace an intramolecular SH3-mediated interaction and permit homodimerization via the leucine zipper and autophosphorylation.

The activation of the JNK pathway is critical for the naturally occurring neuronal cell death in development and may be important in the pathological neuronal cell death of neurodegenerative diseases. The small molecule MLK inhibitors CEP1347 and CEP11004 prevent the activation of the JNK pathway and consequently reduce neuronal cell death in many cell culture and animal models (29). Thus, the cell death program induced by nerve growth factor deprivation in sympathetic neurons is inhibited by MLK inhibitors as a direct consequence of inhibiting downstream kinases of the JNK pathway such as MKK4 and JNK and JNK-activated transcription factors such as c-Jun (30, 31). Intriguingly, it has been reported that MLK inhibition by CEP11004 increases TrkB protein levels in cultures of cerebellar granule neurons (32). Because TrkB is a key tyrosine receptor for brain-derived neurotrophic factor involved in differentiation and survival in the nervous system (33), MLK inhibitors would also up-regulate cell survival circuits. Previous work in our laboratory has demonstrated that E47 and NeuroD bHLH proteins bind to p21^{CIP1} and TrkB promoters linking differentiation and cell cycle arrest in SH-SY5Y neuroblastoma cells (34). In this study we show that MLK2 binds to and phosphorylates E47 at the AD2 transactivation domain and, as a consequence, represses TrkB promoter activity. Our results provide a molecular link that explains why MLK inhibition not only prevents activation of cell death processes but also enhances cell survival signaling.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmid Constructions—Plasmids pCMV-E47 (35) and SRD-MLK2 (36) contain the full-length cDNAs of human E47 and MLK2, respectively. MLK2 was tagged at its N terminus with a triple FLAG epitope and subcloned under the cytomegalovirus promoter to produce pCYC573, where several derivatives containing different fragments from MLK2 were obtained: pCYC833 (1–364 aa), pCYC843 (1–496 aa), pCYC844 (1–757 aa), and pCYC716 (327–954 aa). A K125A mutation was introduced to obtain a kinase-dead MLK2 mutant in pCYC742 using XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene). A tandem affinity purification (TAP)-E47 fusion under the cytomegalovirus promoter (pCYC304) was also used to obtain derivatives with different fragments of E47: pCYC306 (1–220 aa), pCYC831 (221–330 aa), pCYC830 (331–400 aa), pCYC925 (331–460 aa), pCYC305 (1–540 aa), pCYC 307 (100–540 aa), and pCYC308 (100–490 aa). Point mutations within full-length E47 produced plasmids pCYC805 (S379A), pCYC899 (S352A/T355A/S359A/S379A, referred to as S/T4A), and pCYC920 (S341A/S352A/T355A/S359A/S379A, referred to as S/T5A). Point mutations within TAP-tagged E47 peptides produced plasmids pCYC836 (S341A), pCYC837 (S352A, T355A, S359A), pCYC838 (S379A), and pCYC926 (S/T5A) pGEX-KG (GE Life Sciences) derivatives containing GST fusions to E47 peptides were pCYC907 (331–460 aa) and pCYC903 (361–460 aa), and corresponding S/T5A (S341A/S352A/T355A/S359A/S379A) and S379A derivatives were pCYC921 and pCYC905, respectively. N-terminal (1–496 aa) wild-type and kinase-dead (K125A) MLK2 fusions to GST produced pCYC846 and pCYC848, respectively. The TrkB luciferase reporter construct (pCYC219) carries a 1.9-kb fragment from positions –1888 to +30 nucleotides relative to the main transcription start site of human *TrkB* promoter inserted into pGL3b (Promega).

Cell Culture—SH-SY5Y neuroblastoma cells, mouse embryonic fibroblasts (MEFs), HEK293T cells, and GP2–293T cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 20 units/ml penicillin, 20 μg/ml streptomycin, and 10% fetal bovine serum (Invitrogen). To induce cell cycle arrest and differentiation in SH-SY5Y cells, all-trans-retinoic acid (RA; Sigma) was added to a final concentration of 10 μM for 5 days. The medium was changed every 3 days. MEFs and SH-SY5Y cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen), and HEK293T and GP2–293T were transfected with polyethylenimine (Sigma-Aldrich), following standard protocols. Primary cultures of cerebellar granule neurons were prepared from postnatal day 7 Sprague-Dawley rat pups as described previously (32). The cells were dissociated by 1 mg/ml trypsin for 15 min prior to mechanical trituration, plated in poly-L-lysine-coated dishes at a density of 3 × 10⁵ cells/ml and maintained in basal Eagle's medium with 25 mM KCl, 10% dialyzed fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin. Aphidicolin (3.3 μg/ml) was added 1 day later to reduce the number of non-neuronal cells. The MLK inhibitor CEP-11004 was kindly provided by Cephalon, Inc. (West Chester, PA). Stocks solutions of CEP-11004 (4 mM) were prepared in dimethyl sulfox-

E47 Phosphorylation by MLK Represses TrkB Expression

ide, and a working 40 μM solution was prepared in 1% bovine serum albumin/basal Eagle's medium on the day of the experiment.

Tandem Affinity Purification—TAP-tagged N-terminal (1–220 aa) or C-terminal (100–651 aa) human E47 fragments or TAP control cDNAs were cloned into a retroviral expression vector (pBABE-puro) to obtain pCYC313, pCYC315 and pCYC316, respectively. Retroviruses were produced in GP2–293T packaging cells by transfection of pBABE-puro derivatives and helper pVSV-G. The cells were maintained at 32 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Supernatant containing viruses was recovered after 48, 72, and 96 h, filtered (0.45 μm), and used for SH-SY5Y infection with the addition of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene. After 2 days, the medium was removed, and infected cells were selected with 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin. A pBABE-puro derivative expressing green fluorescent protein (pCYC186) was used to estimate infection efficiencies. Ten 150-mm plates (8×10^6 cells seeded), and twenty 150-mm plates (5×10^6 cells seeded) were used for TAP experiments with proliferating or RA-differentiated SH-SY5Y cells, respectively. The cells were lysed in TNT buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT) with 2 mM MgCl_2 and protease and phosphatase inhibitors and centrifuged for 3 min at $200 \times g$. Triton X-100 was raised to 1% whenever the large C-terminal fragment of E47 was used. Obtained supernatants were first used for immunoprecipitation with 100 μl of IgG Sepharose 6 Fast Flow beads (Amersham Biosciences) for 2 h. After five washes, 300 units/ml AcTEV protease (Invitrogen) was added to the column, which was incubated for 2 h at room temperature to elute E47 in TNT buffer with 0.5 mM EDTA. The second immunoprecipitation was carried out with calmodulin beads (Stratagene) in TNT buffer with 1 mM magnesium acetate, 1 mM imidazole, and 2 mM CaCl_2 . After five washes, calmodulin beads were suspended in 50 mM $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$, pH 8, and proteins were analyzed by nano-liquid chromatography coupled to nano-electrospray ionization and tandem mass spectrometry analysis.

Protein Phosphatase Treatment—HEK293T cells were co-transfected with E47 and MLK2 expression plasmids in 60-mm plates. One day after transfection, the cells were lysed in 200 μl of 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 125 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitors; sonicated on ice; and spun for 10 min at $12,000 \times g$. Supernatant was divided into 50- μl aliquots and treated with 4 units of SAP (shrimp alkaline phosphatase; Roche Applied Science) or 400 units of λ protein phosphatase (NEB) as directed by the supplier. Phosphatase inhibitors (1 mM sodium fluoride, 1 mM β -glycerophosphate, 5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM EGTA) were added when indicated. The samples were incubated 90 min at 37 °C (SAP) or 30 °C (λ phosphatase). To stop the reaction, $2 \times$ SDS-PAGE loading buffer was added, and the samples were analyzed by Western blot.

Immunoprecipitation and Western Blot Analysis—For immunoprecipitation experiments, HEK293T cells were harvested 24 h after transfection. The cells were resuspended in lysis buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 125 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluo-

ride, protease, and phosphatase inhibitors), sonicated on ice, and spun for 10 min at $12,000 \times g$. The supernatants were incubated with 50 μl of $\alpha\text{FLAG M2}$ -agarose beads (Sigma). The samples were rocked for 2 h at 4 °C, and the beads were collected by centrifugation (1 min at $2000 \times g$), washed three times with 1 ml of cold lysis buffer, and finally resuspended in loading buffer, boiled, and loaded onto SDS-PAGE gels. Western blot analysis was performed as previously described (34) with αE47 (SC-763), αFLAG (Sigma), horseradish peroxidase- α -horseradish peroxidase (Sigma), $\alpha\text{pS63-c-Jun}$ (Cell Signaling), and αJNK (Cell Signaling) antibodies used as recommended by the suppliers.

Luciferase Assays—Luciferase were performed essentially as described (34) with a dual luciferase reporter assay system (Promega). Routinely, 1 μg of firefly luciferase reporter plasmid and 0.05 μg of *Renilla* luciferase pRL-TK control plasmid (Promega) were used to determine relative expression values. To assess effects caused by E47 or MLK2, 0.8 or 0.2 μg of each expression plasmid (or empty vector) were added to each transfection assay. Firefly/*Renilla* luciferase ratios obtained from a promoterless vector were subtracted as background, and the resulting values were normalized to control conditions.

Production and Purification of Recombinant Proteins—All of the GST fusions were expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) by adding 0.4 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside to cultures at a cell density of 0.3 A_{600} and subsequent incubation for 4 h at 30 °C. The proteins were purified using glutathione-Sepharose beads as directed by the supplier (Amersham Biosciences) in 500 μl of lysis buffer containing 25 mM HEPES, pH 7.9, 0.3 M KCl, 1 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM DTT, and protease inhibitors. Elution buffer contained 40 mM reduced glutathione, 20 mM NaCl, 0.5 mM DTT, and 50 mM Tris-HCl, pH 8.

In Vitro Kinase Assay—Kinase reactions were carried out in 20 μl (20 mM HEPES, pH 7.5, 15 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 0.1 mM Na_3VO_4 , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, protease, and phosphatase inhibitors) containing 25 μM nonradioactive ATP, 5 μCi of [γ - ^{32}P]ATP, 0.2 μg of GST-MLK2 (or GST-MLK2 KD), and 2 μg of the corresponding substrate proteins and were incubated for 20 min at 30 °C. Phosphorylated products were separated by SDS-PAGE, stained with Coomassie Brilliant Blue to ensure equal loading of substrate proteins and MLK2 kinase, dried, and analyzed by autoradiography.

Reverse Transcription Real Time PCR—RNA was extracted (RNeasy kit; Qiagen), treated with DNaseI (Qiagen), and reverse transcribed with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Relative mRNA levels were determined by quantitative real time PCR using TaqMan probes from Applied Biosystems, TrkB (Hs 001778811_m1), and transferrin receptor (TFRC) (4333770F) for SH-SY5Y cells, TrkB 5' (Rn 01441749), TrkB 3' (Rn 00820626), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Rn 01749022_g1) for cerebellar granule neurons. PCRs were run and analyzed with an iCycler iQ real time detection system (Bio-Rad).

RESULTS

E47 Interacts with MLK2—To identify neuronal proteins that interact with transcriptional complexes containing E47, we

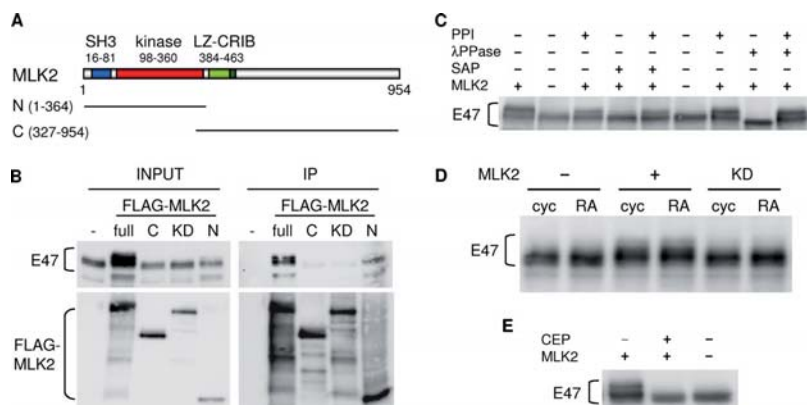


FIGURE 1. MLK2 interacts with E47 enhancing its phosphorylation level. *A*, scheme showing the different domains in MLK2. SH3, Src homology 3 motif; LZ, leucine zipper. The N-terminal (N, 1–364 aa) and C-terminal (C, 327–954 aa) MLK2 moieties used in immunoprecipitation assays are depicted. *B*, *in vivo* interaction between MLK2 and E47. HEK293T cells were transfected with full E47 and the indicated FLAG-MLK2 (full, N-terminal, C-terminal, and kinase-dead (KD) mutant) constructs. Immunoprecipitation was carried out with α FLAG beads, and E47 and FLAG-MLK2 levels in input and immunoprecipitation (IP) samples were analyzed by Western blot. *C*, E47 phosphorylation by MLK2 in HEK293T cells. Cell extracts from HEK293T transfected with E47 and MLK2 were treated with λ (*l*APPase) or shrimp alkaline (*SAP*) phosphatases and/or phosphatase inhibitors (*PPP*). E47 phosphorylation was assessed as a shift in mobility by Western blot. *D*, E47 phosphorylation by MLK2 in proliferating (*cyc*) or RA-differentiating (*RA*) SH-SY5Y cells. *E*, effect of the MLK2 inhibitor CEP11004 on MLK2-mediated E47 phosphorylation. HEK293T cells were transfected with MLK2 and E47 and treated with 400 nM CEP11004 for 24 h. E47 phosphorylation levels were analyzed by Western blot.

carried out TAP experiments using E47 as bait in SH-SY5Y human neuroblastoma cells either proliferating or undergoing differentiation with RA (37). SH-SY5Y cells were infected with retroviral vectors expressing TAP-tagged human N-terminal (1–220 aa) or C-terminal (100–651 aa) E47 moieties and subsequently selected by puromycin treatment. Purified E47-TAP complexes were analyzed by nano-liquid chromatography coupled to nano-electrospray ionization and tandem mass spectrometry analysis. One of the identified peptides specifically present in the N-terminal E47-TAP pull-down was matched to MLK2, one of the mixed lineage kinases that had been initially identified as signaling effectors in the nervous system (17, 38, 39). To confirm and analyze further the interaction between E47 and MLK2, HEK293T cells were transfected with full-length E47 and different FLAG-tagged MLK2 constructs (Fig. 1A), and corresponding cell extracts were used for immunoprecipitation experiments with α FLAG beads. Although the interaction of E47 with full-length FLAG-MLK2 was readily detected (Fig. 1B), the co-immunoprecipitation efficiency decreased significantly when only the C-terminal moiety of MLK2 was used, suggesting that the interacting region would lie in the N-terminal sequences of MLK2 that include the SH3 motif and the kinase domain. In agreement with this, the N-terminal region of MLK2 was sufficient to co-immunoprecipitate E47 at a similar relative efficiency compared with full-length MLK2. Finally, supporting a key role for the kinase activity of MLK2, a kinase-dead mutant of MLK2 was unable to co-immunoprecipitate E47 (Fig. 1B). Because MLKs undergo autophosphorylation to become fully active (17, 19), this result suggests that autophosphorylation might also be important to acquire a competent conformation to interact with E47. NeuroD overexpression did not affect co-immunoprecipitation of E47 and

FLAG-MLK2, suggesting that NeuroD would not mediate their interaction (25). Indeed, MLK2 requires its LZ domain to interact with NeuroD (25), although it is not involved in its interaction with E47 (Fig. 1B).

MLK2 Enhances Phosphorylation of E47—A shift in the mobility of E47 was visible by Western blot of HEK293T cell extracts when wild-type MLK2, but not the kinase-dead mutant (KD), was co-expressed (Fig. 1B). Because MLK2 has been shown to be constitutively active when overexpressed (36), our observations would suggest that MLK2 phosphorylates E47, either directly or indirectly. The retarded E47 bands caused by MLK2 co-expression collapsed into a faster migrating band after treatment of cell extracts with shrimp alkaline phosphatase (Fig. 1C), demonstrating that MLK2 enhances phosphorylation of E47. Moreover, treatment

of cell extracts with λ protein phosphatase also revealed a basal phosphorylation status for E47 in HEK293T cells, which likely reflects the demonstrated participation of other kinases in E47 phosphorylation (9–16). A kinase-dependent shift in E47 mobility was also observed in extracts from SH-SY5Y cells transfected with MLK2, either cycling or undergoing differentiation with RA (Fig. 1D). Finally, phosphorylation of E47 was inhibited when MLK2-expressing cells were treated with CEP11004, a specific MLK inhibitor (Fig. 1E). In summary, our results indicate that MLK2 induces E47 phosphorylation *in vivo*.

MLK2 Inhibits E47 Transactivation Activity on the TrkB Promoter—Because MLK2 had been implicated in NeuroD modulation (25) and nuclear receptor co-repression (26), we wanted to study the effects of MLK2 overexpression on E47 transcriptional activity. We had shown that E47 is able to activate the TrkB promoter through E-box sequences important for achieving full transcriptional activity during SH-SY5Y differentiation (34). Thus, we used our previously established luciferase-reporter assay to analyze the role of MLK2 on E47 transcriptional activity. MLK2 was able to inhibit most effects caused by E47 co-expression on TrkB-promoter reporter expression in both proliferating and RA-treated cells (Fig. 2), whereas it had no significant effect on corresponding reporter basal levels. This inhibition was due neither to lower E47 protein levels in the presence of MLK2 (Fig. 1D) nor to a change in E47 intracellular localization, which was mostly nuclear under these conditions (data not shown). Moreover, the MLK2 kinase-dead mutant was unable to exert this inhibition (Fig. 2), which reinforced the notion that MLK2 regulates E47 through phosphorylation. Interestingly, MLK2 was not able to revert E47-mediated activation of the p21^{CIP1} promoter (data not

E47 Phosphorylation by MLK Represses TrkB Expression

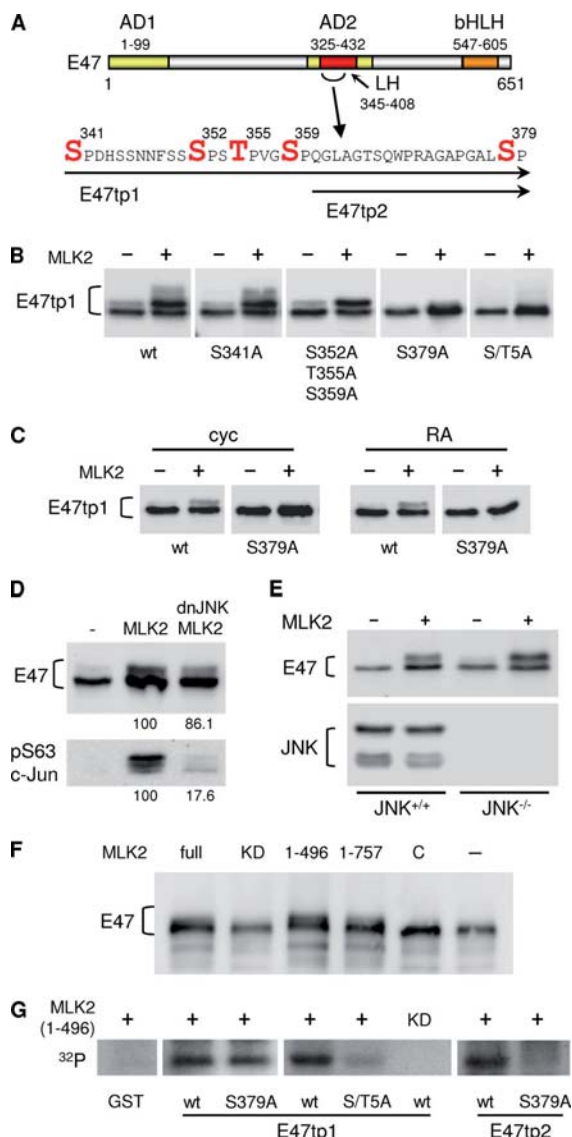


FIGURE 4. MLK2 phosphorylates Ser/Thr residues within the LH motif of the AD2 activation domain. *A*, serine or threonine residues mutated in the AD2 activation domain of E47 are indicated in red. E47tp1 and E47tp2 indicate the extent of target peptides analyzed. *B* and *C*, effects of serine or threonine mutations to alanine on E47 phosphorylation by MLK2. TAP-tagged E47 constructs were transfected in the presence or absence of MLK2 in HEK293T (*B*) or SH-SY5Y (*C*) cells either cycling (*cyc*) or RA-treated (*RA*), and E47 mobility was analyzed by Western blot. The quintuple S/T5A mutant contains the following changes: S341A, S352A, T355A, S359A, and S379A. *D*, E47 phosphorylation by MLK2 and JNK in HEK293T cells. Cell extracts from HEK293T transfected with E47, MLK2, and a dominant-negative form of JNK (*dnJNK*) were used to analyze phosphorylation of E47 as a shift in mobility by Western blot. Ser⁶³-phosphorylated c-Jun is shown as control for phosphorylation efficiencies, which are shown as relative percentage values below the corresponding lanes. *E*, E47 phosphorylation by MLK2 in JNK-deficient MEFs. Western blot analysis of E47 in the presence of transfected MLK2 in JNK^{+/+} and JNK^{-/-} (double null JNK1 JNK2 mutant) MEFs. JNK proteins were also detected as control. *F*, analysis of E47 full-length phosphorylation by different MLK2 constructs. E47 was transfected in HEK293T together with constructs carrying different fragments of MLK2. *full*, N-terminal 1–496 aa or 1–757 aa

binant fragment (1–496 aa) of MLK2 that retains its kinase competence (Ref. 43 and see Fig. 4F) and exhibits a sufficient solubility in *E. coli* for efficient purification under native conditions (data not shown). We found that this fragment of MLK2, but not a kinase-dead mutant, strongly phosphorylated the abovementioned E47 peptide spanning residues 331–460 (Fig. 4G). Although the S379A mutant was still efficiently phosphorylated by MLK2, phosphorylation of the S/T5A quintuple mutant was severely reduced (Fig. 4G), indicating that the identified Ser/Thr residues are all important phosphorylation targets of MLK2. Although MLK2 phosphorylated very efficiently a shorter peptide that only contained Ser³⁷⁹, phosphorylation of a S379A mutant in this shorter context was undetectable. In summary, MLK2 phosphorylates *in vitro* at least five Ser/Thr residues within the LH motif that plays a key role as a transcriptional activation domain of E47 (7).

Transcriptional Repression by MLK2 Requires the Ser/Thr Target Residues within the LH Motif of E47—To test whether MLK2 would inhibit the transcriptional activation domain of E47 by phosphorylation of the identified target residues within the LH motif, we co-expressed different E47 mutants with wild-type and kinase-dead MLK2 proteins and analyzed TrkB promoter-driven expression by the aforementioned luciferase assay (Fig. 5A). Although the single S379A mutant was not significantly resistant to MLK2-mediated inhibition, expression produced by a quadruple mutant (S352A/T355A/S359A/S379A, referred to as S/T4A) was significantly higher in the presence of MLK2. Moreover, expression levels attained by the S/T5A quintuple mutant were almost unaffected by co-expression of MLK2, indicating that MLK2-mediated repression effects require the same Ser/Thr residues in E47 that are phosphorylated both *in vitro* and *in vivo* by MLK2. The different E47 mutants stimulated TrkB promoter-driven expression very similarly in the absence of MLK2, which suggests that the serine/threonine to alanine substitutions introduced do not cause important functional or structural alterations in E47. In summary, these results give support to the notion that MLK2 inhibits E47 transcriptional activity by direct phosphorylation of Ser/Thr residues within the LH motif.

MLK Inhibits TrkB Expression in Neuronal Cells—Inhibition of MLKs by CEP11004 has been shown to increase TrkB protein levels in cerebellar granule neurons (32), and our results suggest that, because MLK2 inhibits E47 activity, MLKs could regulate TrkB expression at a transcriptional level. To test the functional relevance of MLKs on endogenous TrkB transcription in a neuronal differentiation paradigm, we used SH-SY5Y cells in the presence or absence of RA to stimulate or not E47-driven transcription, respectively (34), and samples were collected from three independent experiments to determine TrkB and TFRC (as control) mRNA levels by reverse transcription real time PCR. Relative TrkB expression levels in the absence of RA were very low and insensitive to MLK inhibition (data not shown),

fragments, a C-terminal 327–954 aa fragment (C), and a kinase-dead (KD) mutant. E47 phosphorylation was assessed by Western blot. *G*, MLK2 *in vitro* kinase assay. Bacterially expressed E47tp1 and E47tp2 target peptides, as well as their S379A or S/T5A mutants, were purified as GST fusions and subjected to *in vitro* kinase assays with recombinant N-terminal MLK2 (1–496 aa). Corresponding autoradiographies are shown. *wt*, wild type; *KD*, kinase-dead.

E47 Phosphorylation by MLK Represses TrkB Expression

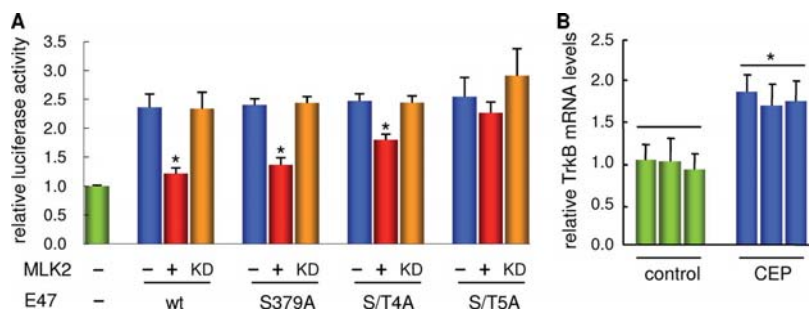


FIGURE 5. Transcriptional repression by MLK2 requires the Ser/Thr target residues identified within the LH motif of E47. *A*, effects of Ser/Thr mutations on the ability of E47 to activate TrkB promoter-driven expression in the presence of MLK2. SH-SY5Y cells treated for 3–4 days with RA were transfected with a TrkB-promoter luciferase reporter and the indicated E47 constructs in the presence or absence of either wild-type (*wt*) or a kinase-dead (*KD*) mutant of MLK2 and harvested 1 day after transfection to determine luciferase activities. The quadruple S/T4A mutant contains the following changes: S352A, T355A, S359A, and S379A. The quintuple S/T5A mutant contains S341A as an additional change. The mean values and standard errors of five independent transfection experiments are plotted. Significant differences ($\alpha = 0.05$) within sets of same E47 variant are indicated with an asterisk. *B*, effect of MLK inhibitor CEP11004 on TrkB mRNA expression in SH-SY5Y cells. Proliferating SH-SY5Y cells were deprived from trophic factors in the presence of RA and treated or not with 400 nM CEP11004 for 24 h. Reverse transcription real time PCR analysis of TrkB was made relative to TFRC as control. The mean values and standard errors of three independent determinations from three independent experiments are shown. Significant differences ($\alpha = 0.05$) with control are indicated with an asterisk.

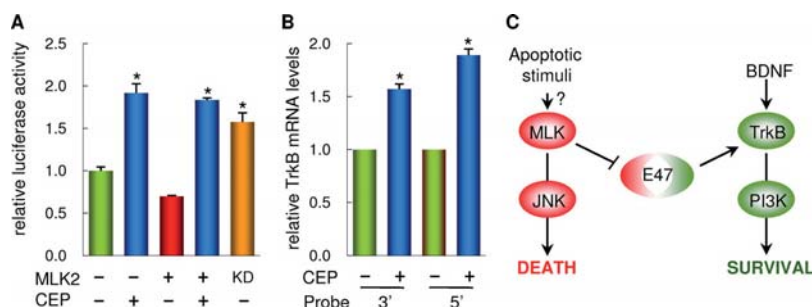


FIGURE 6. MLK2 inhibits TrkB expression in cerebellar granule neurons. *A*, MLK2 inhibition up-regulates TrkB promoter-driven expression. Cerebellar granule neurons cultured for 6 days were transfected with a TrkB-promoter luciferase reporter and either wild-type or a kinase-dead (*KD*) mutant of MLK2 and treated or not with 400 nM CEP11004 for 18 h after transfection to determine luciferase activities. Mean values and standard errors of six independent transfection experiments are plotted. Significant differences ($\alpha = 0.05$) with control are indicated with an asterisk. *B*, effect of MLK inhibition on TrkB expression in cerebellar granule neurons treated or not with 400 nM CEP11004 for 24 h. Reverse transcription real time PCR analysis of TrkB was done with two different probes targeting 5' and 3' sequences of the TrkB mRNA, and the results obtained were made relative to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as control. Mean values and standard errors of six independent determinations are shown. Significant differences ($\alpha = 0.05$) with control are indicated with an asterisk. *C*, scheme showing the molecular link established by E47 between the JNK and phosphatidylinositol 3-kinase pathways to determine the cell toward death or survival. When trophic signals are high, E47 would provide with a high level of Trk receptors to activate cell survival pathways. On the contrary, in the presence of apoptotic stimuli, increasingly active MLK proteins would lead to JNK-mediated cell death and, in addition, limit E47-dependent Trk expression to abate cell survival signals. Thus, E47 inhibition by MLK appears as an important link that would negatively coordinate cell death and survival pathways in neurons.

but, as expected from our previous work (34), they were easily detected under RA-elicited differentiation conditions. More importantly, TrkB mRNA expression levels showed a clear increase in cells treated with CEP11004 (Fig. 5*B*). Similar results were obtained in cerebellar granule neurons. Thus, TrkB promoter-driven expression was clearly stimulated by the addition of CEP11004, even under MLK2 overexpression conditions (Fig. 6*A*). Because MLKs require dimerization for autophosphorylation and full activation (17), we used the MLK2 kinase-dead protein as a dominant mutant and found that it also stimulated TrkB promoter-driven expression (Fig. 6*A*). Finally,

MLK inhibition by CEP11004 caused a clear increase of TrkB mRNA levels in cerebellar granule neurons levels as determined with two different probes targeted to 5' and 3' sequences of the TrkB mRNA (Fig. 6*B*). These results demonstrate that the MLK inhibitor CEP11004 increases expression of TrkB at the mRNA level and support our findings that point to MLK as a key repressor of E47-driven expression in neurons.

DISCUSSION

In a previous study we reported that bHLH protein E47 binds to E-box sequences within the promoter of the TrkB gene and activates its transcription (34). Here we show that MLK2 kinase, whose activity has been involved in the regulation of JNK pathway (17, 39), represses TrkB promoter activity by phosphorylating E47 in a JNK-independent manner. In particular, we show that phosphorylation of Ser/Thr residues within the LH motif of the AD2 activation domain inhibits E47 as a transcriptional activator of TrkB. Moreover, inhibition of MLK activity by CEP11004 (32) increases TrkB expression levels in cerebellar granule neurons and differentiating SH-SY5Y neuroblastoma cells. These findings point to a novel molecular mechanism by which MLK regulates TrkB expression by phosphorylating the E47 transcription factor.

The molecular mechanisms that control the transcriptional activity of E47 are not fully understood but appear to involve both positive and negative regulatory factors. Previous work has demonstrated that p38 MAPK activates muscle-specific

gene transcription. Phosphorylation of E47 at Ser¹⁴⁰ by p38 MAPK enhances MyoD/E47 heterodimerization and subsequent binding to E-box sequences (12). Other results may suggest that p38 MAPK could exert a negative effect by phosphorylating other residues in the N terminus of E47 (13). Although this post-translational modifications would involve the N-terminal sequences of E47 that contain the AD1 activation domain, studies conducted by Quong *et al.* (7) and Aronheim *et al.* (5) identified a LH region within the AD2 activation domain capable of forming a loop structure between amino acids 345 and 394, and an amphipathic α helix between amino acids 395

and 408. Interestingly, this region showed different transactivation properties depending on the cell line used (5), suggesting that it would likely be regulated by lineage-specific co-activators and/or co-repressors. As a relevant example, c-Jun has been reported to inhibit the transactivation potential of the AD2 activation domain of E47 (8). Although the mechanism by which c-Jun represses E47 transactivation activity remained to be elucidated, these authors demonstrated that serines at positions 63 and 73 in c-Jun were not involved in the repression mechanism. Phosphorylation of these serine residues by JNK is essential for c-Jun activation (44), but not for binding to activators such as ATF-2 (45), which would rule out the possibility that the MLK2 effect on E47 activity is mediated by downstream activation of JNK.

MLK2 is predominantly expressed in brain, and it is localized in both the cytoplasm and nucleus (26, 46). Previous studies have reported interactions between MLK2 and components of transcriptional complexes. Thus, MLK2 has been shown to phosphorylate and enhance the silencing activity of Alien, a co-repressor for nuclear receptors. The authors suggested that this mechanism would represent a link between MLK2 and transcriptional repression of target genes during neuronal differentiation (26). On the other hand, it has been reported that MLK2 interacts with and phosphorylates NeuroD via the Huntingtin protein in mouse N2A neuroblastoma cells (25). Unfortunately, because NeuroD activity was assayed very indirectly as the fraction of *Xenopus* embryos displaying ectopic neurons after mRNA injection, a direct consequence on the transactivation properties of NeuroD was not demonstrated. In any event, the domains of MLK2 required for binding NeuroD and E47 are different. Although NeuroD requires the LZ domain of MLK2 (25), it is totally dispensable for E47 interaction.

Studies with neuronal models have involved MLKs as mediators of apoptosis induced by trophic factor deprivation (31, 38). On the one hand, perhaps with the participation of Cdc42, MLK would sense trophic factor limiting conditions to activate JNK and induce c-Jun-dependent and -independent processes leading to apoptosis (31). On the other hand, Wang *et al.* (32) have shown that the MLK inhibitor CEP11004 increases TrkA and TrkB protein levels in both central and peripheral nervous systems, this activation process important being for phosphatidylinositol 3-kinase-mediated long term survival. Thus, the authors of this work proposed that MLK inhibitors would not only inhibit the JNK apoptotic pathway but, as they raised Trk receptor protein levels, they would also increase cell responsiveness to trophic factors. This dual effect could explain the protective action of MLK inhibitors in models of neuronal injury and neurodegeneration such as Alzheimer's disease, where basal forebrain cholinergic neurons down-regulate TrkA expression in aged rats (47). We show here that MLK2 phosphorylates E47 and represses its activity as a transcription factor, thus reducing TrkB expression levels as a direct consequence. Our results provide with a direct molecular link between the JNK and phosphatidylinositol 3-kinase pathways and would explain the effects caused by MLK inhibitors on Trk receptor levels and long term survival (see scheme in Fig. 6C).

It has been shown that the interaction between the SH3 domain of MLK2 and the proline-rich N terminus of Hunting-

tin inhibits MLK2 activity in HEK293T and HN33 cells (48), and it has been proposed that, in normal cells, MLK2 would be sequestered in an inactive form by binding of its SH3 domain to the N terminus of Huntingtin (17, 48). In Huntington disease, the polyglutamine-expanded mutant versions of Huntingtin would fail to bind MLK2 and, as a consequence, cause JNK activation and apoptosis (48). Interestingly, Ginés *et al.* (49) have shown that levels of TrkB receptor protein are diminished in a knock-in mouse model of Huntington disease. This observation could also be explained taking into account that, as we show here, unwanted MLK activation should inhibit E47-dependent expression of TrkB, raising the question as to whether enforced expression of TrkB could delay Huntington disease progression.

Neuron survival during development of the nervous system is at least in part determined by the limited availability of target-derived growth factors, which act to inhibit programmed cell death (50). Then, to ensure that apoptosis is only triggered once trophic factor levels fall below a precise threshold, mechanisms should exist that add robustness and convert linear response systems into switch-like devices. In our scheme (Fig. 6C), when trophic signals are high, E47 would ensure plenty expression levels of Trk receptors and positively contribute to activate cell survival pathways. On the contrary, when trophic factor availability becomes limiting, increasing levels of active MLK by apoptotic signals would raise JNK-mediated effects to boost cell death and, in parallel, reduce E47-dependent Trk expression levels to decrease cell survival signals even further. Thus, E47 would serve as a link between phosphatidylinositol 3-kinase and JNK pathways to promptly incline neurons toward survival or death.

Acknowledgments—We gratefully acknowledge Sònia Rius and Roser Pané for technical assistance, Enrique Calvo (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Instituto de Salud Carlos III) for mass spectrometry analysis, Carme Caelles (Institut de Recerca Biomèdica Barcelona) for the dominant-negative form of JNK cDNA, and E. Wagner and A. Muñoz for providing mouse JNK^{-/-} fibroblasts. We sincerely thank Gary L. Johnson, Pura Muñoz-Cánovas, and Eugene Johnson, Jr. for helpful comments. We are also thankful to Masataka Nakamura, Syu-ichi Hirai, and Elisa Izaurralde for generously providing us with plasmids or reagents. We appreciate the help received from the members of our group.

REFERENCES

1. Massari, M. E., and Murre, C. (2000) *Mol. Cell Biol.* **20**, 429–440
2. Blackwell, T. K., and Weintraub, H. (1990) *Science* **250**, 1104–1110
3. Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B. (1987) *Cell* **51**, 987–1000
4. Norton, J. D. (2000) *J. Cell Sci.* **113**, 3897–3905
5. Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A., and Walker, M. D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 8063–8067
6. Massari, M. E., Jennings, P. A., and Murre, C. (1996) *Mol. Cell Biol.* **16**, 121–129
7. Quong, M. W., Massari, M. E., Zwart, R., and Murre, C. (1993) *Mol. Cell Biol.* **13**, 792–800
8. Robinson, G. L., Henderson, E., Massari, M. E., Murre, C., and Stein, R. (1995) *Mol. Cell Biol.* **15**, 1398–1404
9. Sloan, S. R., Shen, C. P., McCarrick-Walmsley, R., and Kadesch, T. (1996) *Mol. Cell Biol.* **16**, 6900–6908
10. Johnson, S. E., Wang, X., Hardy, S., Taparowsky, E. J., and Konieczny, S. F.

E47 Phosphorylation by MLK Represses TrkB Expression

- (1996) *Mol. Cell Biol.* **16**, 1604–1613
11. Cole, F., Zhang, W., Geyra, A., Kang, J. S., and Krauss, R. S. (2004) *Dev. Cell* **7**, 843–854
 12. Lluís, F., Ballestar, E., Suelves, M., Esteller, M., and Muñoz-Cánoves, P. (2005) *EMBO J.* **24**, 974–984
 13. Page, J. L., Wang, X., Sordillo, L. M., and Johnson, S. E. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 30966–30972
 14. Neufeld, B., Grosse-Wilde, A., Hoffmeyer, A., Jordan, B. W., Chen, P., Dinev, D., Ludwig, S., and Rapp, U. R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 20239–20242
 15. Nie, L., Xu, M., Vladimirova, A., and Sun, X. H. (2003) *EMBO J.* **22**, 5780–5792
 16. King, A. M., Van der Put, E., Blomberg, B. B., and Riley, R. L. (2007) *J. Immunol.* **178**, 3521–3529
 17. Gallo, K. A., and Johnson, G. L. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 663–672
 18. Zhao, Z. S., and Manser, E. (2005) *Biochem. J.* **386**, 201–214
 19. Handley, M. E., Rasaiyaah, J., Chain, B. M., and Katz, D. R. (2007) *Int. J. Exp. Pathol.* **88**, 111–126
 20. Dorow, D. S., Devereux, L., Dietzsch, E., and De Kretser, T. (1993) *Eur. J. Biochem.* **213**, 701–710
 21. Ing, Y. L., Leung, I. W., Heng, H. H., Tsui, L. C., and Lassam, N. J. (1994) *Oncogene* **9**, 1745–1750
 22. Sakuma, H., Ikeda, A., Oka, S., Kozutsumi, Y., Zanetta, J. P., and Kawasaki, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28622–28629
 23. Swenson, K. I., Winkler, K. E., and Means, A. R. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 156–172
 24. Chadee, D. N., and Kyriakis, J. M. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 770–776
 25. Marcora, E., Gowan, K., and Lee, J. E. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9578–9583
 26. Eckey, M., Tenbaum, S. P., Muñoz, A., and Banihmad, A. (2003) *Mol. Cell Endocrinol.* **213**, 71–78
 27. Leung, I. W., and Lassam, N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 1961–1967
 28. Teramoto, H., Coso, O. A., Miyata, H., Igishi, T., Miki, T., and Gutkind, J. S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 27225–27228
 29. Wang, L. H., Besirli, C. G., and Johnson, E. M., Jr. (2004) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 451–474
 30. Maroney, A. C., Glicksman, M. A., Basma, A. N., Walton, K. M., Knight, E., Jr., Murphy, C. A., Bartlett, B. A., Finn, J. P., Angeles, T., Matsuda, Y., Neff, N. T., and Dionne, C. A. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 104–111
 31. Harris, C. A., Deshmukh, M., Tsui-Pierchala, B., Maroney, A. C., and Johnson, E. M., Jr. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 103–113
 32. Wang, L. H., Paden, A. J., and Johnson, E. M., Jr. (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 1007–1019
 33. Lei, L., and Parada, L. F. (2007) *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 522–532
 34. Liu, Y., Encinas, M., Comella, J. X., Aldea, M., and Gallego, C. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 2662–2672
 35. Funato, N., Ohtani, K., Ohyama, K., Kuroda, T., and Nakamura, M. (2001) *Mol. Cell Biol.* **21**, 7416–7428
 36. Hirai, S., Katoh, M., Terada, M., Kyriakis, J. M., Zon, L. I., Rana, A., Avruch, J., and Ohno, S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15167–15173
 37. Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C., and Comella, J. X. (2000) *J. Neurochem.* **75**, 991–1003
 38. Silva, R. M., Kuan, C. Y., Rakic, P., and Burke, R. E. (2005) *Mov. Disord.* **20**, 653–664
 39. Handley, M. E., Rasaiyaah, J., Barnett, J., Thakker, M., Pollara, G., Katz, D. R., and Chain, B. M. (2007) *Int. Immunol.* **13**, 923–933
 40. Takekawa, M., Tatebayashi, K., and Saito, H. (2005) *Mol. Cell* **18**, 295–306
 41. Yan, M., Dai, T., Deak, J. C., Kyriakis, J. M., Zon, L. I., Woodgett, J. R., and Templeton, D. J. (1994) *Nature* **372**, 798–800
 42. Tibbles, L. A., Ing, Y. L., Kiefer, F., Chan, J., Iscove, N., Woodgett, J. R., and Lassam, N. J. (1996) *EMBO J.* **15**, 7026–7035
 43. Phelan, D. R., Price, G., Liu, Y. F., and Dorow, D. S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10801–10810
 44. Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M., and Karin, M. (1991) *Nature* **354**, 494–496
 45. van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P., and Angel, P. (1995) *EMBO J.* **14**, 1798–1811
 46. Phelan, D. R., Loveland, K. L., Devereux, L., and Dorow, D. S. (1999) *Mol. Reprod. Dev.* **52**, 135–140
 47. Boissiere, F., Fauchoux, B., Ruberg, M., Agid, Y., and Hirsch, E. C. (1997) *Exp. Neurol.* **145**, 245–252
 48. Liu, Y. F., Dorow, D., and Marshall, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 19035–19040
 49. Ginés, S., Bosch, M., Marco, S., Gavaldà, N., Díaz-Hernández, M., Lucas, J. J., Canals, J. M., and Alberch, J. (2006) *Eur. J. Neurosci.* **23**, 649–658
 50. Deshmukh, M., Johnson, E. M., Jr. (1997) *Mol. Pharmacol.* **51**, 897–906

Protein Kinase KIS Localizes to RNA Granules and Enhances Local Translation[∇]

Serafi Cambray,‡ Neus Pedraza,‡ Marta Rafel, Eloi Garí, Martí Aldea, and Carme Gallego*

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, IRBLLEIDA, Universitat de Lleida, Montserrat Roig, 2, 25008 Lleida, Catalonia, Spain

Received 26 July 2008/Returned for modification 22 August 2008/Accepted 10 November 2008

The regulation of mRNA transport is a fundamental process for cytoplasmic sorting of transcripts and spatially controlled translational derepression once properly localized. There is growing evidence that translation is locally modulated as a result of specific synaptic inputs. However, the underlying molecular mechanisms that regulate this translational process are just emerging. We show that KIS, a serine/threonine kinase functionally related to microtubule dynamics and axon development, interacts with three proteins found in RNA granules: KIF3A, NonO, and eEF1A. KIS localizes to RNA granules and colocalizes with the KIF3A kinesin and the β -actin mRNA in cultured cortical neurons. In addition, KIS is found associated with KIF3A and 10 RNP-transported mRNAs in brain extracts. The results of knockdown experiments indicate that KIS is required for normal neurite outgrowth. More important, the kinase activity of KIS stimulates 3' untranslated region-dependent local translation in neuritic projections. We propose that KIS is a component of the molecular device that modulates translation in RNA-transporting granules as a result of local signals.

There are two important reasons why proteins are localized through their mRNAs rather than directly. First, mRNA localization not only targets the protein to the correct region of the cell but also prevents its expression elsewhere. The second reason for localizing a protein through its mRNA is that it devolves the control of protein expression to individual regions of the cytoplasm. This allows a cell to respond rapidly to a local requirement for the protein and makes it possible to regulate gene expression independently in different subcompartments of the cell (21, 32, 37). These factors are particularly important in large and highly polarized cells, such as neurons, where translation of localized mRNAs in growth cones seems to be important for axon guidance, whereas local control of protein synthesis in dendrites contributes to synaptic plasticity (6, 36). Localized mRNAs are usually transported in large ribonucleoprotein particles (RNPs), which have been referred to as RNA granules. It is thought that this structure serves to prevent premature mRNA translation/degradation during transport and that mRNAs might be released into a translationally competent form by locally originated signals (23, 33). RNPs vary in composition and include multiple mRNAs, ribosomes, and regulatory proteins, as well as molecular-motor proteins (2). Two studies using different approaches have attempted a molecular characterization of RNPs isolated from neural tissue. The first study used kinesin KIF5A in an affinity purification approach and identified a large number of proteins in granules from the adult mouse brain, including known regulators of mRNA transport (Pur α and Staufen1) and eukaryotic translation factors (eIF2A and eEF1A), as well as CaMKII α and Arc mRNAs (19). The second study (9) isolated a fraction enriched

in RNPs from embryonic rat brains and demonstrated the presence of the β -actin mRNA and dynein as a motor protein. Nevertheless, the two RNP preparations had many common components, including several heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs), SYNCRIP, FMRP, Pur α , Staufen1, and RNA helicases. Finally, Tau mRNA and kinesin protein 3A (KIF3A) have been found associated in P19 neurons in culture (3). Recently, a great deal of research has focused on the regulation of dendritic mRNA translation in neurons, addressing two distinct questions: first, how are mRNAs transported into dendrites, and second, how is the translation of these mRNAs regulated? It is now clear that both processes involve mRNA-binding proteins that are primarily bound to the 3' untranslated region (UTR) of responsive mRNAs (35). The best-studied examples are the *trans*-acting factors ZBP1 and CPEB1, which bind a 54-nucleotide (nt) sequence in the 3' UTR of β -actin mRNA and a 170-nt sequence in the 3' UTR of CaMKII α mRNA, respectively, with both interactions required for proper mRNA localization and translational inhibition (16, 17, 30).

KIS was first identified as a kinase that interacts with stathmin (28), a phosphoprotein that controls microtubule dynamics with a role in axon development (39). On the other hand, KIS has been described as a negative regulator of the Cdk inhibitor p27^{KIP1}, thus promoting cell cycle progression in a fibroblast line (5). Finally, Manceau et al. (29) have shown in vitro that KIS phosphorylates the splicing factor SF1 on two adjacent SP motifs and enhances the formation of the SF1-U2AF⁶⁵-RNA ternary complex, which suggests that KIS may participate in RNA splicing. Here, we show that KIS interacts with KIF3A, NonO, and eEF1A, three proteins found in RNA granules; colocalizes with KIF3A kinesin in neurites; and is important for neurite outgrowth. Furthermore, KIS associates with the RNP-transported mRNAs and stimulates translation driven by the β -actin 3' UTR, suggesting that KIS could help

* Corresponding author. Mailing address: Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, IRBLLEIDA, Universitat de Lleida, Montserrat Roig, 2, 25008 Lleida, Catalonia, Spain. Phone: 34 973702438. Fax: 34 973702426. E-mail: carme.gallego@cmb.udl.cat.

‡ S.C. and N.P. contributed equally to this work.

∇ Published ahead of print on 17 November 2008.

activate the translation of specific mRNAs by locally originated signals.

MATERIALS AND METHODS

Cortical-cell culture, expression vectors, and siRNAs. Cerebral cortices of embryonic day 14 mouse embryos were dissociated and cultured in neurobasal medium (Gibco) plus 1% N2, 2% B27, 0.5 mM L-glutamine, and 20 ng/ml brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Preprotech) on polylysine-laminin-coated plates or glass coverslips at 75,000 cells/cm². The medium was replaced every 2 days. *Mus musculus* KIS (IMAGE ID, 6414877) fused to three copies of the FLAG or hemagglutinin (HA) epitope was cloned under the cytomegalovirus promoter in a lentiviral vector derived from pDLS (Invitrogen) by removing the green fluorescent protein (GFP) transcriptional unit. Tagged versions (FLAG or HA) of KIF3A (obtained from two-hybrid experiments) and KIS were also cloned into pcDNA3 (Invitrogen). The KIS kinase-dead K54A mutant (K54^{KD}) (5) was generated using CGCCCTTGGCGAGTTCCTGCCTCC (the mutation is underlined) and GCAGGAAGAACCGGTGAGCAAAAGG as mutation and selection primers, respectively, and the Transformer Site-Directed Mutagenesis kit (Clontech). KIS and KIS^{KD} were cloned into the DsRed vector (Clontech) to obtain red-fluorescent derivatives. To obtain myr-dGFP^{lec3-3'UTR} (see below), a Cdk5 myristoylation signal (MGTVLSLSPSY) was added to the forward primer (CGCGAGATCTATGGGCACGGTGTCTGCCGTCTCCCA GCTACGCCAGTCCAAGCACGGCT) during amplification of the destabilized *Zoanthus* sp. GFP sequences (Clontech). The final pcDNA3 derivatives contained the zipcode sequence from the 3' UTR of β -actin (nt 1208 to 1264; NM_007393). Purified small interfering RNA (siRNA) duplexes (Sigma-Prologo) were as described previously (5) and contained the following sequences: mouse KIS, GCAGUUCUGGCCUCCGGGAdTdT, and control, CUUACGUGAG UACUUGCAdTdT. Transfection of cortical neurons was performed 3 days after plating them with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Details of all constructs are available upon request.

Lentivirus production and infection. HEK293T cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with equal amounts of lentiviral expression vector, envelope plasmid pVSV.G, and packaging plasmid pHR'82AR and cultured in neurobasal medium supplemented as described above. The lentiviruses were harvested 3 days after transfection, filtered through 0.45- μ m cellulose acetate syringe filters, and diluted 1:1 in fresh neurobasal medium with supplements before use. Cortical cells were infected during plating, and the medium was replaced after 2 days.

Yeast two-hybrid screens. Full-length mouse KIS was fused to the Gal4 DNA-binding domain in pGBKT7, transformed into AH109 (*MATa* trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 *gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2 URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ MEL1*), and used as bait to screen an embryonic day 11 mouse embryo cDNA library in pGADT7-Rec (Clontech) and an adult mouse brain cDNA library in pACT2 (Clontech) following the instructions given by the manufacturer. Positive clones were identified on plates lacking leucine, tryptophan, and histidine with 25 mM 3-aminotriazole.

Immunoprecipitations, immunoblotting, and real-time reverse transcription (RT)-PCR analysis. HEK293T cells were harvested 24 h after transfection with the appropriate plasmids. Cells were resuspended in lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 125 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM EDTA, phosphatase inhibitors, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitors), and extracts were sonicated on ice and spun for 10 min at 14,000 rpm. The supernatants were added to 50 μ l of anti-FLAG-agarose (M2; Sigma), and samples were rocked for 2 h at 4°C. The beads were collected by centrifugation (1 min at 2,000 rpm), washed three times with 1 ml of cold lysis buffer, and finally resuspended in loading buffer, boiled, and loaded onto sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels.

The immunoprecipitation protocol applied to mouse brain extracts was as described previously (10). Endogenous KIS protein was immunoprecipitated from 1.5 ml of brain extract (protein concentration, 30 mg/ml) with 40 μ l of α KIS antiserum (Isogen Life Science, Maarsse, Holland) raised against the DYLEN EDEYEDVVEDVKEE peptide as described previously (5). The same protocol was adapted to immunoprecipitate FLAG-KIS complexes from cortical neurons. Briefly, neurons infected with a lentivirus expressing FLAG-KIS and cultured for 7 days were homogenized in lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, protease inhibitors, and 100 U/ml RNase inhibitor [Invitrogen]). Following two rounds of centrifugation (10 min at 1,000 \times g and 10 min at 10,000 \times g), the supernatant was incubated with 50 μ l of anti-FLAG-agarose (M2; Sigma) preblocked for 1 h with 0.2% bovine serum albumin,

0.5 mg/ml tRNA in lysis buffer. Samples were rocked at 4°C overnight and subjected to five 30-min washes with lysis buffer with 250 mM NaCl.

Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore), and the primary antibodies used in detection steps were against whole KIS (1:50; polyclonal; produced in collaboration with AbBCN), HA (1:2,500; monoclonal 12CA5; our own ascitic fluid stocks), FLAG (1:200; polyclonal F7425; Sigma), NonO (1:1,000; monoclonal 3; BD Transduction Laboratory), KIF3A (1:250; monoclonal 28; BD Transduction Laboratory), eEF1A (1:200; monoclonal CBP-KK1; Upstate Biotechnology), PSF (pyrimidine tract binding protein-associated splicing factor) (1:1,000; monoclonal B92; Sigma), tubulin (1:2,000; monoclonal DM1A; Sigma), and hnRNP A2/B1/B2 (1:500; monoclonal 10D1; kindly provided by S. Piñol-Roma). Appropriate peroxidase-linked secondary antibodies (1:10,000; GE Healthcare UK Ltd.) were detected using SuperSignal West Dura (Pierce). To detect KIS in α KIS immunoprecipitates (IP), the eluted material was solubilized in the absence of 2-mercaptoethanol to avoid immunoglobulin G heavy-chain interference in the 50-kDa range during sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In addition, anti-KIS antibodies used for Western detection were detected by sequential incubation with biotinylated protein A (1:1,000; Sigma) and peroxidase-linked streptavidin (1:1,000; Sigma). Chemiluminescence originated from Western blots was recorded with the aid of a charge-coupled-device-based camera (Lumimager; Roche), and the images were analyzed with the provided software to obtain accumulated pixel values for the indicated bands. To quantify immunoprecipitation efficiencies, NonO, KIF3A, and eEF1A levels were first made relative to the FLAG-KIS levels in the corresponding IP and then expressed as percentages of the values obtained with whole FLAG-KIS protein.

RNA in IP was extracted (RNeasy kit; Qiagen), treated with DNase I (Qiagen), and reverse transcribed with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). The ratios of the several mRNAs tested to GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA were determined by quantitative real-time PCR using TaqMan probes for ACTB (*M. musculus* numbers are in parentheses) (00607939_s1), GRIA1 (00433753_m1), GRIA2 (00442822_m1), ARC (00479619_g1), MAPT (00521988_m1), MTAP2 (00485236_m1), NTRK2 (00435422_m1), TFRC (00441941_m1), CAMK2a (00437967_m1), SYAP1 (00481965_m1), PGAM1 (phosphoglycerate mutase 1) (02526975_g1), and GAPDH (99999915_g1) from Applied Biosystems. PCRs were run and analyzed with an iCycler iQ real-time detection system (Bio-Rad).

Isolation of RNA granules. The protocol for isolation of RNA granules was adapted from Kanai et al. (19). Lentivirus-infected cortical neurons were cultured for 7 days and homogenized in IMAC buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM potassium acetate, 1 mM magnesium acetate, 1 mM EGTA supplemented with protease inhibitors) containing 100 U/ml RNase inhibitor (Invitrogen) when indicated. The homogenate was fractionated by successive centrifugation steps to yield the indicated pellets (P) and supernatants (S). Total extracts were centrifuged at 1,000 \times g for 10 min, giving rise to S1 and P1. The S1 supernatant was centrifuged at 10,000 \times g for 10 min, yielding S2 and P2. The S2 supernatant was centrifuged at 100,000 \times g for 1 h, resulting in S3 and P3. To investigate the effect of RNase, fraction S2 was incubated on ice for 2 h with 10 μ g/ml RNase A (Amersham) prior to the last centrifugation.

Immunofluorescence, RNA staining, in situ hybridization, and live-cell imaging. One week after infection, cortical cells were quickly washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. The fixed cells were permeabilized with 0.5% Tween 20 in PBS for 2 min and blocked with 10% fetal calf serum for 30 min. Primary antibodies against HA (1:250; rat monoclonal 3F10; Roche) and KIF3A (1:250; monoclonal 28; BD Transduction Laboratory) were used in PBS with 1% fetal calf serum. Lentiviral HA-KIS levels were detected by sequential incubation with goat α rat and rabbit anti-goat antibodies labeled with Alexa 555 (1:500; Molecular Probes), while endogenous KIF3A was detected by incubation with an Alexa 488 rabbit anti-mouse antibody (1:500; Molecular Probes). For RNA staining, cells were incubated with 500 nM Syto14 for 15 min prior to fixation, and Alexa 647 secondary antibodies (Molecular Probes) were used for HA-KIS immunofluorescence. RNase treatment caused a severe reduction of Syto14 staining (data not shown). β -Actin mRNA detection by fluorescence in situ hybridization (FISH) in cortical neurons expressing HA-KIS was essentially as described previously (<http://www.singerlab.org/protocols>). The probes corresponded to positions in the rat β -actin mRNA chosen by Huttelmaier et al. (17): TXCAATGG GGTACTXCAGGGTCAGGAXACCTCTCTTGXCTGGGCCTCGX, XGC CTGTGGXACGACGACAGGACAGGACAGGACACAGCCXGGATG GCX, XCAGCAATGCXGGGTCATGTGTGGXACCACAGACAGCAGCAXGTGTTGGCAX, and AGGGXGAGGGACTTCCXGTAACCACCTAXTTC ATGGAXACTTGGAAAGGAC, where X is amino-allyl C6-dT (DNA Technology A/S). Amino-allyl groups were labeled with Cy3 dye in 100 mM sodium

bicarbonate, pH 9.0, for 2 h at room temperature, as instructed by the manufacturer (Amersham), and the labeled probes were purified with Qiaex II (Qiagen). Following the hybridization and washing steps, HA-KIS was detected by immunofluorescence as described above with Alexa 488-labeled secondary antibodies (Molecular Probes). Images were acquired with an Olympus FV500 confocal system using a 60 \times objective on an Olympus IX81 inverted microscope. For *in vivo* fluorescence analysis, the medium was replaced with physiology buffer containing 119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 25 mM HEPES, pH 7.5, 30 mM glucose, and 100 nM BDNF, and the cells were kept at 37°C (DH-40i chamber; Warner) during observation for up to 30 min. Images were acquired using 20 \times and 40 \times objectives on an Olympus IX71 inverted microscope and DP manager software or 40 \times and 60 \times objectives on a Zeiss Axio Observer Z1 microscope and Axiovision 4.3 software.

Neurite length and single-cell expression analysis. Individual neuron tracings of GFP-expressing cells were measured using the NeuronJ plug-in developed by Erik Meijering for ImageJ (NIH) software. For each GFP-expressing cell, the number of neurites, the greatest neurite length, and the total neurite length were determined, and mean values per cell for each condition were obtained. For single-cell expression analysis using myr-dGFP^{Actb-3'UTR} or GFP^{Actb-3'UTR} (see below), images were acquired with parameters that maximized the range of pixel intensities for the neuritic signal. Identical acquisition parameters and settings were used for both control and experimental samples when their direct comparison was required. Using these parameters, the cell body fluorescence intensity was necessarily saturated. To prevent saturation, a different exposure time was used when the cell body DsRed fluorescence was analyzed. To analyze neuritic GFP^{Actb-3'UTR} expression levels, we first eliminated the whole soma area from the fluorescence image using the freehand selection tool. Then, we obtained a baseline pixel value as a result of multiplying the image background by three, and the mean of the neuritic pixel intensity over the baseline value was calculated from pixel intensity histograms built by ImageJ. As expected (17, 41), raw fluorescence values obtained from GFP were ca. 20 times higher than those from GFP^{Actb-3'UTR} in control cells. Prior to statistical analysis, the GFP fluorescence value for each cell was normalized to the mean value obtained from the respective control cells. A similar approach was used to determine and normalize DsRed levels in the neuronal soma. The relative values obtained were very similar for DsRed, DsRed-KIS, and DsRed-KIS^{KD} (data not shown), indicating that there were no major differences in transfection and expression efficiencies in independent experiments. To measure the fluorescence levels of myr-dGFP^{Actb-3'UTR} particles, a macro was written in AxioVision 4.3 Commander to obtain the distance to soma and the total fluorescence for each particle. Levels of myr-dGFP^{Actb-3'UTR} were determined by real-time RT-PCR as described above with a custom TaqMan probe (Applied Biosystems) (the coordinates relative to the *Zoanthus* sp. GFP ATG were 407 to 431 for the forward primer, 468 to 488 for the reverse primer, and 432 to 447 for the TaqMan probe).

RESULTS

KIS interacts with proteins of RNA granules. KIS is the only known protein kinase that possesses a U2AF homology motif (UHM), which is found immediately C-terminal to the kinase motif (KM) (Fig. 1A). Although the serine/threonine kinase domain has little homology to known kinases, a K54A^{KD} mutation in the putative active center of KIS ablates its kinase activity (28). The C-terminal region presents a 42% sequence similarity to U2AF65, a 65-kDa subunit of the splicing factor U2AF, which suggests that KIS could be involved in RNA-related processes. In order to explore putative interactions of KIS, we performed a yeast two-hybrid assay (Fig. 1B and C) to screen two mouse cDNA libraries (embryonic and adult brain) with full-length mouse KIS as bait. From the embryonic library, five clones carried full-length cDNA sequences coding for NonO, a protein implicated in a variety of nuclear processes, including transcription and mRNA splicing (20), and two clones encoding an N-terminal fragment (amino acids 48 to 257) of the protein biosynthesis elongation factor eEF1A. These two proteins have been identified in RNA-transporting granules purified from mouse brain (19). From the adult brain library, we isolated three clones encoding a C-terminal frag-

ment (amino acids 448 to 702) of KIF3A, a microtubule-dependent motor protein abundantly expressed in the nervous system. The C-terminal domain of KIF3A is a region with no similarity to other kinesin-related proteins, and it has been proposed as a key determinant for specific interactions with KAP3 or PAR3, a protein involved in neuronal polarity (31). On the other hand, KIF3A has also been shown to be a component of Tau mRNA granules (3). Using two additional baits with different KIS moieties, we observed that interactions with KIF3A and NonO strictly required the N-terminal kinase domain of KIS (Fig. 1B and C). While the UHM was not essential, its deletion caused a significant reduction in the ability of KIS to interact with KIF3A and NonO. The yeast two-hybrid results were confirmed by coimmunoprecipitation experiments in HEK293T cells (Fig. 1D). The three proteins, KIF3A, NonO, and eEF1A, were able to interact with KISΔUHM but not with KISΔKM. Consistent with the two-hybrid assay as well, these interactions were weaker in cells expressing only the kinase domain (KISΔUHM) or a K54A^{KD} kinase-dead mutant (28) than in full-length KIS. These data indicate that the N-terminal domain of KIS is essential for the interaction with the identified proteins, while the C-terminal UHM may play a more indirect role through interaction with additional proteins and/or RNA or by conformational effects at the N-terminal domain. In addition, the kinase activity might be important to modulate the strength of the interactions.

KIS can be found in RNA granules. Since KIF3A, NonO, and eEF1A have previously been identified as components of neuronal RNA granules (3, 19), we explored the possibility that KIS was also localized in these RNA-transporting particles. As available anti-KIS antibodies were not sufficiently specific for immunofluorescence (see Materials and Methods), we used a lentiviral construct that expresses HA-KIS to levels very similar to endogenous KIS (Fig. 2B). Immunofluorescence with anti-HA antibodies revealed a punctate labeling pattern in both axon and dendrites. Figure 2A shows a representative example of a cortical neuron in which an important fraction of the HA-KIS signal colocalizes with RNA, as deduced from Syto14 labeling (24). Next, we performed subcellular fractionation by differential centrifugation of extracts from cortical neurons expressing FLAG-KIS. The distributions of FLAG-KIS, eEF1A, and KIF3A followed very similar patterns—all were RNase resistant—whereas the RNA binding proteins NonO, PSF, and hnRNP A/B disappeared from fraction P3 after RNase treatment (Fig. 2C). Thus, both KIS and KIF3A display behavior very similar to that of KIF5, which has been involved in transporting RNA granules to distal dendrites (19). KIS sedimentation properties were resistant to Triton X-100 (data not shown), making its association with vesicles unlikely. These results indicate that KIS would not require binding to RNA in order to localize to RNA granules, and they agree with the notion that UHM domains are optimized to interact with peptide ligands and may not directly bind RNA (22). Consistent with this, interactions of KIS with KIF3A, NonO, and eEF1A in HEK293T cells were unaffected by RNase treatment (Fig. 1E). Thus, KIS would associate directly with RNP components, such as KIF3A, eEF1A, or NonO, whether they bind to RNA or not. We next examined whether HA-KIS was found associated with the kinesin KIF3A in neurites. Figure 2D shows that the majority of HA-KIS granules included endog-

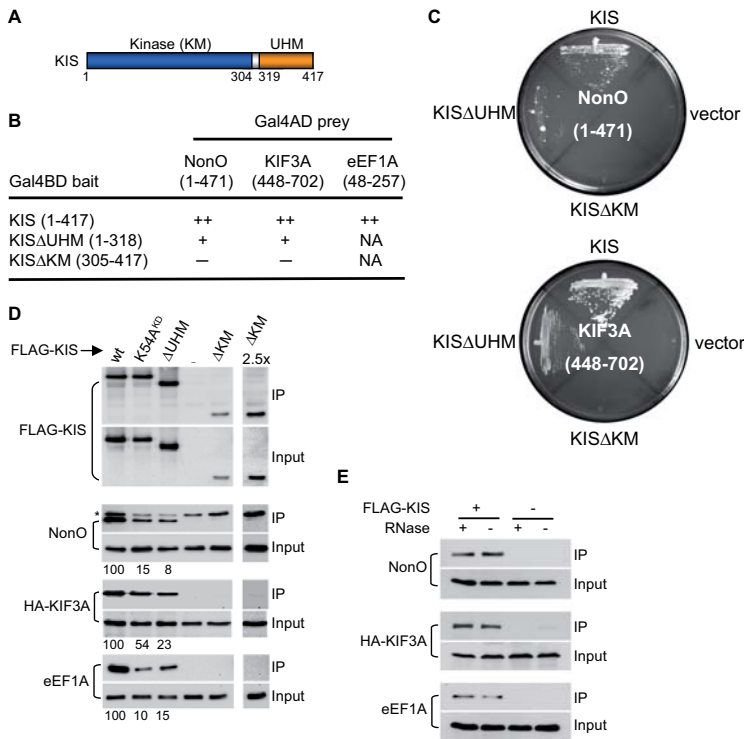


FIG. 1. Interactions of KIS with NonO, KIF3A, and eEF1A in the yeast two-hybrid assay and HEK293T cells. (A) Domain structure of KIS. The numbers refer to amino acids. (B) Two-hybrid interactions of full-length KIS and versions that lack the kinase domain (KISΔKM) or the UHM domain (KISΔUHM) with NonO, KIF3A, and eEF1A. Residues present in bait constructs, as well as positive clones isolated from prey libraries, are shown in parentheses. Full (++) , partial (+) , and no (-) complementation for growth are indicated. (C) Cells were plated in synthetic complete medium without histidine in the presence of 25 mM aminotriazole and incubated at 30°C for 3 days. (D) HEK293T cells expressing FLAG-tagged versions of full-length KIS (wt), a kinase-dead mutant (K54A^{KD}), kinase domain (ΔUHM), UHM domain (ΔKM), or empty vector (-) as a negative control were used for immunoprecipitation with anti-FLAG antibody. The input and anti-FLAG IP were analyzed by Western blotting to detect endogenous NonO and eEF1A or cotransfected HA-KIF3A and FLAG-KIS proteins. The amounts of NonO, HA-KIF3A, and eEF1A proteins in IP were quantitated, and data relative to the respective immunoprecipitated FLAG-KIS proteins are indicated. NonO, HA-KIF3A, and eEF1A were barely detectable in ΔKM IP even after the exposure time was increased 2.5-fold. An immunoglobulin G cross-reactive band is indicated by an asterisk. (E) HEK293T cells expressing FLAG-KIS or transfected with empty vector (-) as a negative control were used for immunoprecipitation with anti-FLAG antibody as described above. Extracts were incubated on ice for 2 h with 10 μg/ml RNase A (+) or 100 U/ml RNase inhibitor (-) prior to immunoprecipitation. The input and anti-FLAG IP were analyzed by Western blotting to detect endogenous NonO and eEF1A or cotransfected HA-KIF3A and FLAG-KIS proteins.

enous KIF3A, indicating that the two proteins might be present in a specific set of RNA granules. Thus, our results suggest that neuritic transport of KIS-containing granules involves the motor protein KIF3A, most likely through a direct interaction with the C-terminal tail of the kinesin.

KIS is required for neuritic outgrowth. KIS is expressed mainly in adult neural tissues, and its expression increases during brain development (28). To determine whether KIS has a relevant role in neuronal function, we tested the effects of KIS knock-down by siRNA as described previously (Fig. 3A) (5). Differentiated cells were cotransfected with a GFP reporter vector and either control or KIS siRNA (Fig. 3B). Cells treated with KIS siRNA showed a clear reduction in total neuritic length and the neurite count per cell (Fig. 3C and D) at 16 h after transfection. At later times, 24 h after transfection, we observed a twofold

increase in the percentage of picnotic nuclei in cells transfected with KIS siRNA compared to the siRNA control (data not shown). These results suggest that KIS has an essential function for neurite outgrowth in cortical neurons. KIF3A has been shown to be required for neurite outgrowth in P19 cells (3), reinforcing the notion that the two proteins could have related roles in neurite development and/or maintenance.

KIS associates with KIF3A and RNP-transported mRNAs in whole-brain extracts. To strengthen the idea that KIS is found associated with KIF3A in neurons, we used whole-brain extracts from newborn mice to immunoprecipitate endogenous KIS with a polyclonal antibody (5). As shown in Fig. 4A, we were able to detect a small fraction of KIF3A in the anti-KIS IP, thus confirming the interaction between the two proteins. On the other hand, we were not able to detect KIS in the

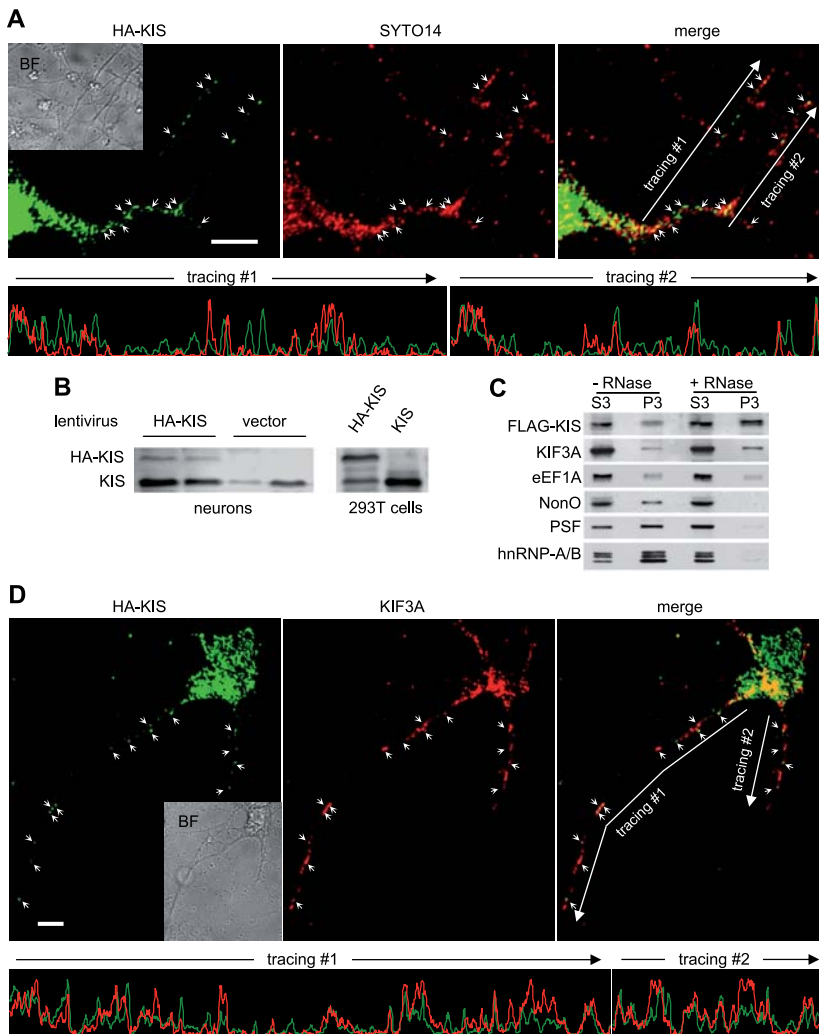


FIG. 2. KIS colocalizes with RNA and KIF3A. (A) Cortical neurons infected with a lentiviral vector expressing HA-KIS were labeled with Syto14 to detect RNA and analyzed by immunofluorescence with an anti-HA antibody. Bar, 5 μ m. The inset shows a reduced bright-field image. Profiles of HA-KIS (green) and Syto14 (red) fluorescence values are shown for the indicated tracings. (B) Western blot analysis of endogenous KIS and lentiviral HA-KIS proteins expressed by cortical neurons. In this experiment, the infection efficiency was ca. 27%, as deduced from immunofluorescence analysis. Lentiviral HA-KIS and endogenous KIS protein levels attained in HEK293T cells are also shown. (C) Subcellular fractionation of cortical cells expressing FLAG-KIS. The final supernatant (S3) and pellets (P3), incubated with (+) or without (-) RNase prior to the last centrifugation, were analyzed by Western blotting with antibodies against KIF3A, eEF1A, NonO, PSF, and hnRNP A/B proteins. FLAG-KIS and NonO proteins were expressed from lentiviral vectors and detected with anti-FLAG and anti-NonO antibodies. (D) Cortical neurons were analyzed by immunofluorescence to detect lentiviral HA-KIS and endogenous KIF3A proteins. Bar, 5 μ m. The inset shows a reduced bright-field image. Profiles of HA-KIS (green) and KIF3A (red) fluorescence values are shown for the indicated tracings.

anti-KIF3A IP, likely as a result of the very low efficiency at which KIF3A was immunoprecipitated with the available antibody. Next, we analyzed anti-KIS IP by real-time RT-PCR to evaluate the presence of a number of mRNAs that are known or proposed to be transported along axons and/or dendrites. Figure 4B shows that the β -actin mRNA was found to be moderately enriched relative to the GAPDH mRNA in anti-KIS IP. Notably, almost all other mRNAs tested were enriched

more than fourfold in anti-KIS IP. As an additional control, levels of the mRNA coding for PGAM1 were very similar to those corresponding to the GAPDH mRNA in all IP. Finally, the plotted values in Fig. 4 are the means of three independent IP experiments that gave comparable results (data not shown). Our data suggest that KIS could associate at different efficiencies with RNPs with distinct mRNAs, which could explain in part why KIS is not present in all RNA particles, as detected by

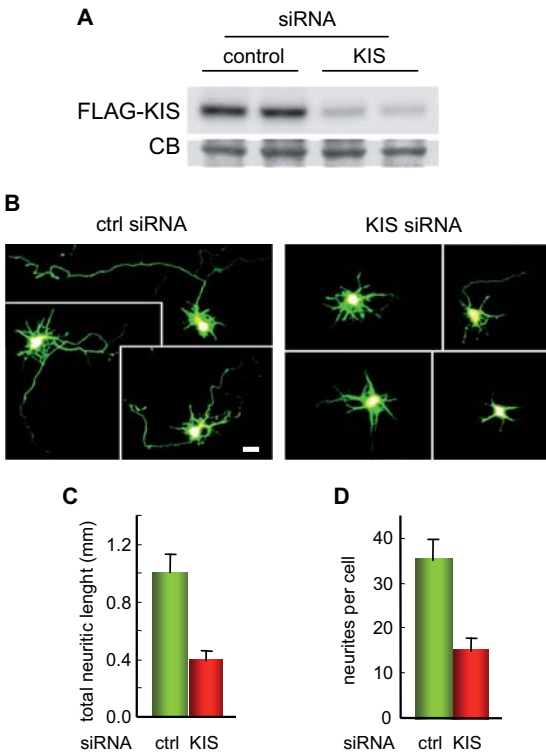


FIG. 3. KIS plays a relevant role in neuritic outgrowth. (A) HEK293T cells were cotransfected with FLAG-KIS and either KIS siRNA or a scrambled control siRNA. Samples were analyzed by Western blotting to detect FLAG-KIS. The corresponding region of the blot stained with Coomassie blue (CB) is shown as a loading control. (B) Cortical neurons were cotransfected with a GFP reporter vector and either control or KIS siRNA and analyzed 16 h after transfection. Representative cells are shown for each condition. Bar, 20 μ m. (C and D) Mean values and confidence limits ($\alpha = 0.01$) for the total neurite length per cell (C) and the number of neurites longer than 3 μ m in each cell (D) were plotted.

Syto14 staining. More importantly, as they were identified with endogenous proteins, these KIS-KIF3A and KIS-mRNA interactions underline the functional relevance of KIS in vivo.

KIS colocalizes with β -actin mRNA in cortical neurons. As the distribution of KIS in neurites is very similar to that described for the β -actin mRNA in embryonic cortical cells and neuroblastoma cell lines (17, 38), we decided to analyze the localization of the β -actin mRNA by FISH and that of HA-KIS by immunofluorescence in cortical neurons. Similarly to ZBP1 (17), KIS colocalized with β -actin mRNA at the leading edge and along neurites of cortical neurons (Fig. 5A). In agreement with the results obtained with whole-brain extracts, we found that the β -actin mRNA was also significantly enriched compared to GAPDH mRNA in FLAG-KIS IP, as deduced from real-time RT-PCR analysis (Fig. 5B and C).

KIS enhances translation driven by the β -actin 3' UTR. An important aspect of mRNA localization involves the inhibition of mRNA expression until it is activated by specific synaptic

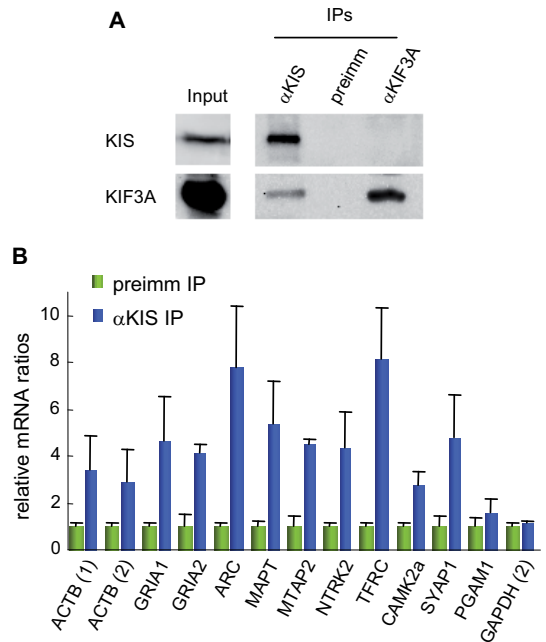


FIG. 4. KIS interacts with KIF3A and RNP-transported mRNAs in postnatal brain extracts. (A) Whole brains from newborn mice were used in immunoprecipitation assays with anti-KIS, anti-KIF3A, or pre-immune antisera. IP and a sample corresponding to 1/200 of the input were analyzed by Western blotting to detect endogenous KIS and KIF3A proteins. (B) IP with anti-KIS and the preimmune (preimm) antisera shown in panel A were used to quantify the relative levels of the indicated mRNAs by real-time RT-PCR. Gene symbols and descriptions are as follows: ACTB, β -actin, cytoplasmic; GRIA1, glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1); GRIA2, glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2); ARC, activity-regulated cytoskeletal-associated protein; MAPT, microtubule-associated protein Tau; MTAP2, microtubule-associated protein 2; NTRK2, neurotrophic tyrosine kinase, receptor TrkB, type 2; TFRC, transferrin receptor; CAMK2a, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha; SYAP1, synapse-associated protein 1. Ratios to GAPDH mRNA were obtained, and the mean values from three independent immunoprecipitation experiments and respective confidence limits ($\alpha = 0.05$) were plotted. In addition, two sets of independent data were obtained for β -actin mRNA (ACTB). PGAM1 and a second measurement for GAPDH (2) were included as controls.

inputs (37). Huttelmaier and colleagues have showed that local control of β -actin protein levels is essential for proper neurite outgrowth and neuronal differentiation (17). In order to test whether KIS is functionally related to local translation, we used GFP^{Actb-3'UTR}, a GFP fusion to the 3' UTR of the β -actin mRNA. As expected from its inhibitory effect on translation (17, 41), fusing the β -actin 3' UTR to GFP caused an important reduction (to ca. 5%) in its overall expression levels. Thus, cortical neurons were cotransfected with GFP or GFP^{Actb-3'UTR} and with DsRed and DsRed fusions to KIS and the KIS^{KD} mutant, and images were obtained 14 to 16 h after transfection (Fig. 6A) for single-cell expression analysis (see Materials and Methods for details). Figure 6B shows that KIS stimulated neuritic GFP^{Actb-3'UTR} levels but not those of control GFP. In

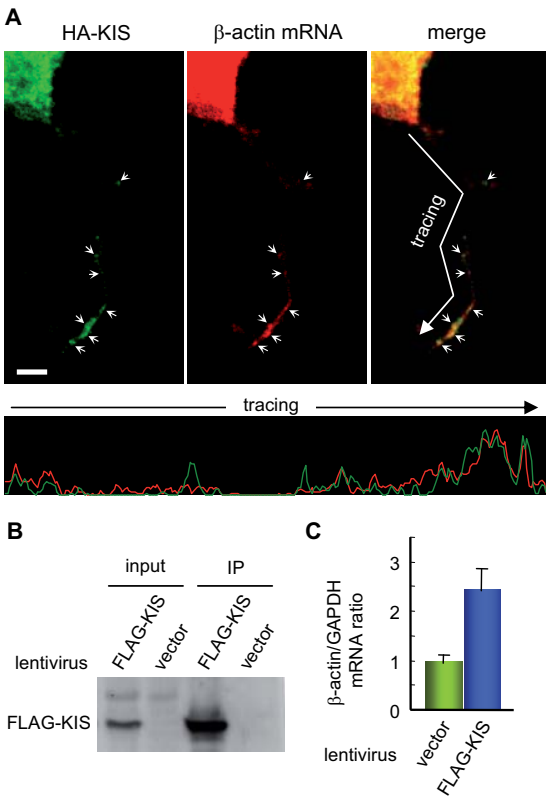


FIG. 5. KIS colocalizes and associates with β -actin mRNA in cortical neurons. (A) Cortical neurons expressing HA-KIS were analyzed by FISH with a β -actin mRNA probe and subsequently processed for immunofluorescence with an anti-HA antibody. Bar, 5 μ m. Profiles of HA-KIS (green) and β -actin mRNA (red) fluorescence values are shown for the indicated tracing. (B) Input extracts and α FLAG IP from cortical neurons infected with a FLAG-KIS lentiviral construct or the empty vector were analyzed by Western blotting. (C) IP shown in panel B were used to determine β -actin/GAPDH mRNA ratios by real-time RT-PCR. The mean values of six measurements from three independent experiments and the respective confidence limits ($\alpha = 0.05$) were plotted.

contrast, KIS^{KD} was not able to increase neuritic GFP^{Actb-3'UTR} levels compared to the control, indicating that the kinase activity of KIS is essential to stimulate neuritic accumulation of GFP^{Actb-3'UTR}. Furthermore, a positive correlation was observed between the neuritic GFP^{Actb-3'UTR} signal and the DsRed-KIS level in soma (Fig. 6C) that was not observed in DsRed-KIS^{KD}-transfected cells or DsRed-transfected control cells (Fig. 6C). Finally, no correlation was observed with any of the DsRed constructs when cotransfected with control GFP (Fig. 6D), which demonstrated the specific dependence on the β -actin 3' UTR and suggested that KIS is not a general activator of translation. In order to avoid cumulative effects of GFP expression, we used a destabilized version of *Zoanthus* sp. GFP fused to a myristoylation consensus sequence at the N terminus (myr-dGFP^{Actb-3'UTR}) to confer membrane lo-

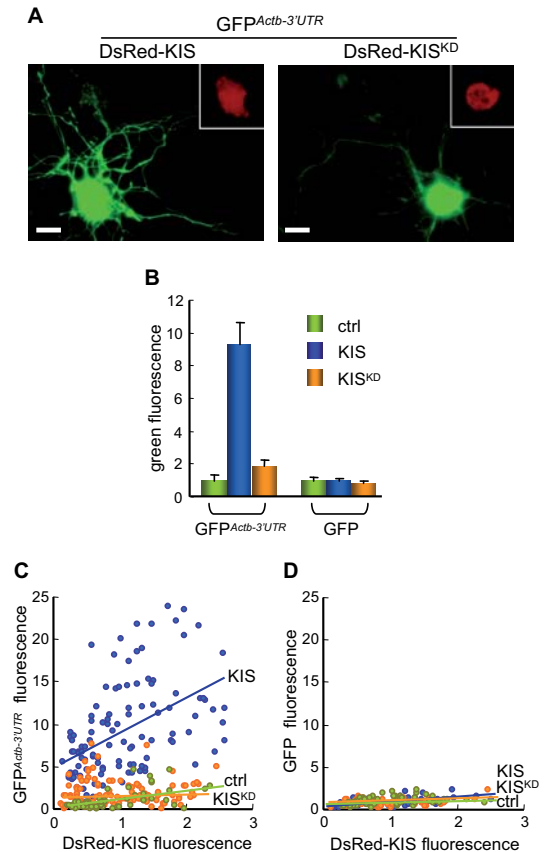


FIG. 6. KIS overexpression increases neuritic GFP^{Actb-3'UTR} levels in a kinase-dependent manner. (A) In vivo fluorescence images of two representative neurons cotransfected with GFP^{Actb-3'UTR} and DsRed fusions to KIS or the KIS^{KD} mutant, which are shown in the corresponding insets as short-exposure images to observe only the red signal in soma. Bars, 10 μ m. (B) Fourteen to 16 h after transfection with GFP^{Actb-3'UTR} or GFP-expressing vectors and either DsRed-, DsRed-KIS-, or DsRed-KIS^{KD}-expressing constructs, green fluorescence in neurites and red fluorescence in soma were quantified and normalized to those of DsRed cells. The mean values ($n \geq 50$) and confidence limits for the mean ($\alpha = 0.01$) are plotted. ctrl, control. (C) Correlation analysis between normalized values of neuritic GFP^{Actb-3'UTR} and normalized values of somatic DsRed, DsRed-KIS, and DsRed-KIS^{KD} levels in the transfected cells analyzed in panel B. (D) Correlation analysis for neuritic GFP signal as in panel C.

calization and limit protein diffusion (1). In contrast to conventional GFP, the myr-dGFP^{Actb-3'UTR} protein produced a punctate pattern (Fig. 7A). To discard possible transcriptional or mRNA stability effects, we measured GFP mRNA levels by real-time RT-PCR and found that they were not significantly altered by cotransfection with vectors expressing DsRed-KIS or DsRed-KIS^{KD} compared to the DsRed control (Fig. 7B). Indeed, the fluorescence level of myr-dGFP^{Actb-3'UTR} particles in DsRed-KIS-expressing cells showed a fivefold increase compared to control cells ex-

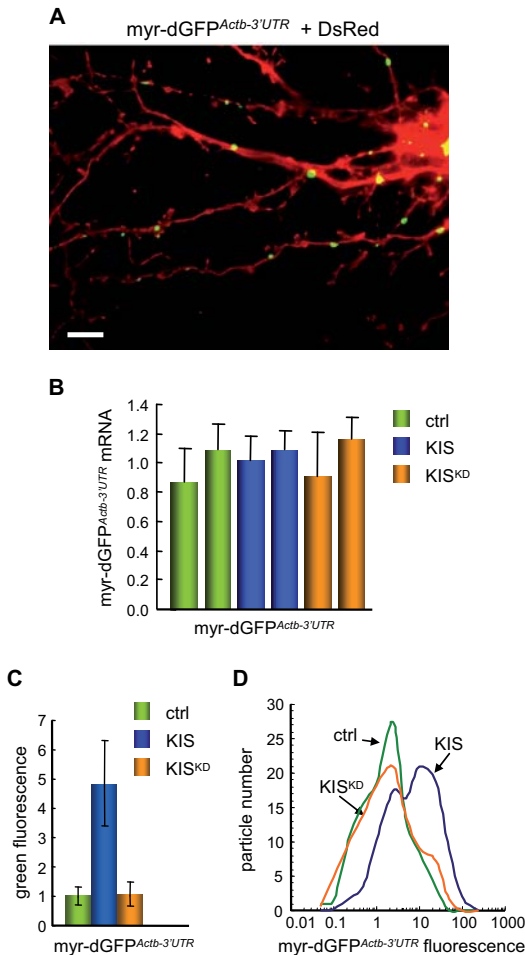


FIG. 7. KIS overexpression stimulates myr-dGFP^{Actb-3'UTR} expression levels in neurites. (A) In vivo fluorescence image of a representative cell cotransfected with myr-dGFP^{Actb-3'UTR} and DsRed. Bar, 5 μ m. (B, C, and D) Cortical neurons were cotransfected with myr-dGFP^{Actb-3'UTR} and either DsRed-, DsRed-KIS-, or DsRed-KIS^{KD}-expressing constructs and incubated for 14 to 16 h. The levels of myr-dGFP^{Actb-3'UTR} mRNA were determined by real-time RT-PCR analysis from equivalent amounts of total RNA, and the mean values and confidence limits ($\alpha = 0.05$) from three measurements of two independent experiments are plotted (B). The total fluorescence in myr-dGFP^{Actb-3'UTR} particles ($n > 650$) was quantified as described in Materials and Methods. Median values with confidence limits ($\alpha = 0.05$) (C) and logarithmic distributions (D) were plotted. ctrl, control.

pressing DsRed or DsRed-KIS^{KD} (Fig. 7C). This increase was observed in most particles of the analyzed population (Fig. 7D). On the other hand, the number of myr-dGFP^{Actb-3'UTR} particles per cell and their distance to soma was not significantly affected by KIS overexpression (data not shown). Thus, our findings underline the physiological relevance of the kinase activity of KIS and support the

notion that KIS acts as a modulator of local translation in cortical neurons.

DISCUSSION

The serine/threonine kinase KIS was initially identified as a protein interacting with stathmin in a two-hybrid system (27), and its expression pattern suggested a role in the developing nervous system and the adult brain (4). KIS has been shown to phosphorylate p27^{Kip1} and to control its subcellular localization, indicating an important role as a regulator of cell cycle progression (5). While the kinase domain of KIS shows no compelling homology with those of other kinases, the C-terminal region presents a 42% sequence similarity to the splicing factor U2AF65. In this sense, KIS has been shown to phosphorylate SF1, a spliceosome assembly factor (29). In the present study, we show that KIS interacts with KIF3A, NonO, and eEF1A, three proteins known to be present in RNA granules (34). The N-terminal domain of KIS is essential for efficient binding to the three proteins, while a kinase-dead mutant showed weaker interactions, which suggests that the kinase activity could modulate the interaction between KIS and components of the RNA granule.

Motor proteins are composed of a head domain with ATPase activity used for microtubule binding, whereas the C-terminal tail contains the cargo-binding domains (15). In this regard, the kinase CamKII α has been shown to phosphorylate the KIF17 kinesin in its C-terminal region, causing dissociation of Mint1, a protein that links the kinesin with its vesicle cargo. Thus, kinesin phosphorylation would unload the transported cargo in the vicinity of the synapse (13). Our results suggest that neuritic transport of KIS-containing granules involves the motor protein KIF3A, most likely through a direct interaction with its C-terminal tail, as deduced from our two-hybrid screen. Since KIS does not phosphorylate KIF3A in vitro (our unpublished results), KIS could phosphorylate other proteins mediating the interaction between the kinesin and its cargo to release the RNA granule at proper sites.

The notion that mRNAs acquire in the nucleus their competence to be specifically sorted in the cytoplasm has been recently strengthened in neurons. Thus, proteins involved in splicing processes, such as hnRNPs, SRs, PSF, or NonO, are also found in RNA granules (19), and several components of the exon junction complex have a role in local mRNA translation, as well (10, 14, 25). Related to these results, KIS has been shown to phosphorylate the spliceosome assembly factor SF1 (29), and we have observed that KIS interacts with NonO and colocalizes with the splicing factor SC35 in nuclear speckles in COS-7 cells (our unpublished results), which suggests that KIS could be recruited to RNP complexes in the nucleus and perform additional essential functions in cortical neurons.

A central emerging theme in the field of dendritic regulation is the possibility of reciprocal interactions between actin dynamics and dendritic protein synthesis in the control of synaptic plasticity (6). A large percentage of ribosomes associate with F-actin in neurons, and microfilament association is necessary for translation from specific RNA granules. The elongation factor eEF1A is known to promote actin bundling independently of its function in translation elongation (8, 26). A recent study of yeast showed that mutations of the actin interaction

region of eEF1A led to improper organization of the actin cytoskeleton and translation inhibition at initiation (not elongation) (11, 12). These findings strongly support a role for eEF1A in assembling actin filaments into a compartment to which mRNA becomes anchored and translated. Finally, phosphorylation of eEF1A in a primary culture of rat cortical neurons treated with BDNF has been shown to be correlated with an increase in translational activity (18, 36). However, as KIS does not phosphorylate eEF1A in vitro (our unpublished results), KIS could phosphorylate other associated proteins to release eEF1A from the actin cytoskeleton and/or increase its activity to enhance local translation of target mRNAs. Accordingly, we show here that KIS stimulates the expression of two different GFP reporter fusions to the β -actin 3' UTR, and this effect is strictly dependent on the kinase activity of KIS. No effect was observed in the absence of the β -actin 3' UTR, indicating that KIS does not act as a general activator of translation. We have found that KIS colocalizes with β -actin mRNA with a pattern similar to what has been reported for β -actin mRNA and protein (40). On the other hand, translation of β -actin in the growth cone is essential for neurite extension. Thus, delocalization of the β -actin mRNA, which causes a decrease of β -actin protein levels at the leading edges of the growth cone, results in growth cone retraction and non-directional growth cone guidance (41). Accordingly, we have found that KIS knockdown causes a strong reduction in the total neuritic length and in the number of neurites per cell in cortical neurons. These results suggest that KIS has an essential role in neuritogenesis, modulating local translation of β -actin mRNA and other RNP-transported mRNAs (7).

Src kinase phosphorylates ZBP1 to relieve β -actin mRNA translation inhibition (17), suggesting that Src could be a trigger factor transmitting local signals originating from tyrosine kinase receptors, such as TrkB. We have compared the KIS sequence with sequences of ZBP1 and other Src targets and found that KIS contains putative phosphorylation and docking sites for Src. We hypothesize that KIS could serve to transmit local Src activation and to phosphorylate additional targets in the RNA granule, thus amplifying the signal and providing further specificity effects. As we discuss above, once activated by Src, KIS could phosphorylate associated proteins to release the RNA granule and stimulate translation elongation at the proper sites. In addition, activation of the kinase activity of KIS would increase its affinity for eEF1A and, to a lesser extent, KIF3A, which should also contribute to the local amplification of the signal. Future studies will be necessary to identify the targets of KIS and to determine the mechanism by which it regulates local expression in neurons.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank I. Navarro and S. Rius for technical assistance and M. Encinas and S. Piñol for the gift of antibodies. We also thank M. Encinas, J. Esquerda, E. Izaurralde, R. H. Singer, J. Valcárcel, and C. Vicario for helpful comments and N. Colomina and J. Torres for critically reading the manuscript.

This work was supported by the Ministry of Education and Science of Spain, Consolider-Ingenio 2010, Fundació La Caixa, and the European Union (FEDER). N.P. is a researcher of the Juan de la Cierva program.

REFERENCES

- Aakalu, G., W. B. Smith, N. Nguyen, C. Jiang, and E. M. Schuman. 2001. Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* **30**:489–502.
- Anderson, P., and N. Kedersha. 2006. RNA granules. *J. Cell Biol.* **172**:803–808.
- Aronov, S., G. Aranda, L. Behar, and I. Ginzburg. 2002. Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J. Cell Sci.* **115**:3817–3827.
- Bièche, I., V. Manceau, P. A. Curmi, I. Laurendeau, S. Lachkar, K. Leroy, D. Vidaud, A. Sobel, and A. Maucuer. 2003. Quantitative RT-PCR reveals a ubiquitous but preferentially neural expression of the KIS gene in rat and human. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **114**:55–64.
- Boehm, M., T. Yoshimoto, M. F. Crook, S. Nallamshetty, A. True, and G. E. Nabel. 2002. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *EMBO J.* **21**:3390–3401.
- Bramham, C. R., and D. G. Wells. 2007. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**:1–14.
- Condeelis, J., and R. H. Singer. 2005. How and why does beta-actin mRNA target? *Biol. Cell* **97**:97–110.
- Edmonds, B. T., J. Wyckoff, Y. G. Yeung, Y. Wang, E. R. Stanley, J. Jones, J. Segall, and J. Condeelis. 1996. Elongation factor-1 α is an overexpressed actin-binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. *J. Cell Sci.* **109**:2705–2714.
- Elvira, G., S. Wasiak, V. Blandford, X. K. Tong, A. Serrano, X. Fan, M. del Rayo Sanchez-Carbente, F. Servant, A. W. Bell, D. Boismenu, J. C. Lacaille, P. S. McPherson, L. DesGroseillers, and W. S. Sossin. 2006. Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol. Cell. Proteomics* **5**:635–651.
- Giorgi, C., G. W. Yeo, M. E. Stone, D. B. Katz, C. Burge, G. Turrigiano, and M. J. Moore. 2007. The EJC factor eIF4AIII modulates synaptic strength and neuronal protein expression. *Cell* **130**:179–191.
- Gross, S. R., and T. G. Kinzy. 2005. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**:772–778.
- Gross, S. R., and T. G. Kinzy. 2007. Improper organization of the actin cytoskeleton affects protein synthesis at initiation. *Mol. Cell. Biol.* **27**:1974–1989.
- Guillaud, L., R. Wong, and N. Hirokawa. 2008. Disruption of KIF17-Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation, a molecular model of kinesin-cargo release. *Nat. Cell Biol.* **1**:19–29.
- Hachet, O., and A. Ephrussi. 2004. Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* **428**:959–963.
- Hirokawa, N., and R. Takemura. 2005. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**:201–214.
- Huang, Y. S., J. H. Carson, E. Barbarese, and J. D. Richter. 2003. Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes Dev.* **17**:638–653.
- Huttelmaier, S., D. Zenklusen, M. Lederer, J. Dichtenberg, M. Lorenz, X. Meng, G. J. Bassell, J. Condeelis, and R. H. Singer. 2005. Spatial regulation of β -actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**:512–515.
- Inamura, N., H. Nawa, and N. Takei. 2005. Enhancement of translation elongation in neurons by brain-derived neurotrophic factor: implications for mammalian target of rapamycin signaling. *J. Neurochem.* **95**:1438–1445.
- Kanai, Y., N. Dohmae, and N. Hirokawa. 2004. Kinesin transports RNA, isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**:513–525.
- Kaneko, S., O. Rozenblatt-Rosen, M. Meyerson, and J. L. Manley. 2007. The multifunctional protein p54^{nrh}/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination. *Genes Dev.* **21**:1779–1789.
- Kiebler, M. A., and G. J. Bassell. 2006. Neuronal RNA granules, movers and makers. *Neuron* **51**:685–690.
- Kielkopf, C. L., S. Lucke, and M. R. Green. 2004. U2AF homology motifs, protein recognition in the RRM world. *Genes Dev.* **18**:1513–1526.
- Kindler, S., H. Wang, D. Richter, and H. Tiedge. 2005. RNA transport and local control of translation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**:223–245.
- Knowles, R. B., J. H. Sabry, M. E. Martone, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, G. J. Bassell, and K. S. Kosik. 1996. Translocation of RNA granules in living neurons. *J. Neurosci.* **16**:7812–7820.
- Le Hir, H., D. Gatfield, I. C. Braun, D. Forler, and E. Izaurralde. 2001. The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO Rep.* **12**:1119–1124.
- Liu, G., W. M. Grant, D. Persky, V. M. Latham, Jr., R. H. Singer, and J. Condeelis. 2002. Interactions of elongation factor 1 α with F-actin and β -actin mRNA: implications for anchoring mRNA in cell protrusions. *Mol. Cell. Biol.* **13**:579–592.
- Maucuer, A., J. P. Le Caer, V. Manceau, and A. Sobel. 2000. Specific Ser-Pro phosphorylation by the RNA-recognition motif containing kinase KIS. *Eur. J. Biochem.* **267**:4456–4464.
- Maucuer, A., S. Ozon, V. Manceau, O. Gavet, S. Lawler, P. Curmi, and A.

- Sobel. 1997. KIS is a protein kinase with an RNA recognition motif. *J. Biol. Chem.* **272**:23151–23156.
29. Manceau, V., M. Swenson, J. P. Le Caer, A. Sobel, C. L. Kielkopf, and A. Maucuer. 2006. Major phosphorylation of SF1 on adjacent Ser-Pro motifs enhances interaction with U2AF65. *FEBS J.* **273**:577–587.
30. Mori, Y., K. Imaizumi, T. Katayama, T. Yoneda, and M. Tohyama. 2000. Two *cis*-acting elements in the 3' untranslated region of α -CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat. Neurosci.* **3**:1079–1084.
31. Nishimura, T., K. Kato, T. Yamaguchi, Y. Fukata, S. Ohno, and K. Kaibuchi. 2004. Role of the PAR-3-KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nat. Cell Biol.* **6**:328–334.
32. Rodriguez, A. J., K. Czaplinski, J. S. Condeelis, and R. H. Singer. 2008. Mechanisms and cellular roles of local protein synthesis in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **127**:49–58.
33. Sonenberg, N., and A. G. Hinnebusch. 2007. New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol. Cell* **28**:721–729.
34. Sossin, W. S., and L. DesGroseillers. 2006. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* **7**:1581–1589.
35. St Johnston, D. 2005. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**:363–375.
36. Sutton, M. A., and E. M. Schuman. 2005. Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J. Neurobiol.* **64**:116–131.
37. Sutton, M. A., and E. M. Schuman. 2006. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* **127**:49–58.
38. Tiruchinapalli, D. M., Y. Oleynikov, S. Kelic, S. M. Shenoy, A. Hartley, P. K. Stanton, R. H. Singer, and G. J. Bassell. 2003. Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and β -actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **23**:3251–3261.
39. Watabe-Uchida, M., K. A. John, J. A. Janas, S. E. Newey, and L. Van Aelst. 2006. The Rac activator DOCK7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18. *Neuron* **51**:727–739.
40. Zhang, H. L., R. H. Singer, and G. J. Bassell. 1999. Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones. *J. Cell Biol.* **147**:59–70.
41. Zhang, H. L., T. Eom, Y. Oleynikov, S. M. Shenoy, D. A. Liebelt, J. B. Dichtenberg, R. H. Singer, and G. J. Bassell. 2001. Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* **31**:261–275.